

**VARPUKASVIEN JA MÄNNYN VAIKUTUS
TYPEN KÄYTTÄYTYMISEEN
METSÄMAAN ORGAANISESSA KERROKSESSA**

Anu Ahvenainen

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

Maaperä- ja ympäristötiede

Helsinki 2017

Esipuhe

Tämä pro gradu -tutkielma on tehty Helsingin yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksella maaperä- ja ympäristötieteen pääaineeseen vuosina 2014–2017. Opinnäytetyö on osa akatemiatutkija Jussi Heinonsalon Nitrofungi-projektia (The interactions between trees and ground vegetation for organic nitrogen uptake via ericoid and ectomycorrhizal fungi). Viiden vuoden mittaisen (2012–2017) tutkimusprojektin tavoitteena on selvittää ilmastonmuutoksen vaikutusta hiilen ja typen varastointikykyyn pohjoisella havumetsävyöhykkeellä sekä parantaa välineitä metsän kasvun mallintamiseen ekosysteemitasolla ilmastonmuutoksen vaikutus huomioiden. Lisäksi projektissa selvitetään maan orgaanisen aineksen hajotuksen, orgaanisen typen oton, symbioottisten sienten ja metsän kasvillisuuden vuorovaikutusta.

Kiitän opinnäytetyöni ohjaajia dos. FT Jussi Heinonsaloa ja MMT Sanna Kanervaa asiantuntevasta, kärsivällisestä ja kannustavasta ohjaustyöstä. Erityiskiitos dos. MMT Aino Smolanderille mahdollisuudesta työskennellä Vantaan Luonnonvarakeskuksen (Luke) yksikössä sekä dos. FT Bartosz Adamczykille avusta laboratoriossa sekä datan käsittelyssä. Lisäksi kiitän FT Antti-Jussi Kieloahoa, FM tohtorikoulutettava Maria Dominguezta sekä laboratoriomestari Marjut Wallneria (HY) ja Anneli Rautiaista (Luke) avusta laboratoriossa. Lopuksi haluan kiittää lämmöllä perhettäni ja ystäviäni tuesta ja kannustuksesta tässä pitkässä prosessissa. Olette olleet äärimmäisen tärkeä voimavara!

Helsingissä huhtikuussa 2017

Anu Ahvenainen

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author			
Anu Anneli Ahvenainen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Varpukasvien ja männyn vaikutus typen käyttäytymiseen metsämaan orgaanisessa kerroksessa			
Oppiaine / Läroämne – Subject			
Maaperä- ja ympäristötiede			
Työn laji/Arbetets art – Level		Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Maisterintutkielma		Huhtikuu 2017	49 s.
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Suomalaisessa havupuuvaltaisessa metsämaassa tyyppi on yleensä kasvien kasvua rajoittavana tekijänä. Tämä aiheutuu siitä, että tyyppi on tällaisessa kasvualustassa sellaisessa orgaanisessa muodossa, joka ei ole kasveille käyttökelpoista. Tyyppi voi olla kompleksoitunut esimerkiksi tiettyihin kasvien tuottamiin sekundaarisiin metaboliatuotteisiin, kuten tanniineihin. Metsäekosysteemeissä tärkeinä typen kiertoon vaikuttavina tekijöinä ovat puiden ja aluskasvien sienijuuret. Niiden toiminta auttaa kasveja saamaan orgaanisessa muodossa olevaa typeä irti, jolloin ne saavat kilpailuedun muihin kasveihin verrattuna.</p> <p>Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää millainen vaikutus mikrokosmoksessa kasvaneilla varpukasveilla (kanerva (<i>Calluna vulgaris</i>), mustikka (<i>Vaccinium myrtillus</i>) ja puolukka (<i>Vaccinium vitis-idaea</i>)) sekä männyllä (<i>Pinus sylvestris</i>) on typen käyttäytymiseen metsämaan orgaanisessa kerroksessa. Mukana oli myös kontrollimaa, jossa ei ollut kasvillisuutta. Koejäsenistä määritettiin orgaaninen aines hehkutushäviöllä, pH, mineraalityppi- ja liukoinen aminohappopitoisuus kuoppalevymenetelmällä, kokonaishiili, kokonaistyyppi ja C/N-suhde sekä maan liukoinen orgaaninen hiili ja liukoinen tyyppi. Lisäksi maasta määritettiin hydrolysoituva ja vaikeasti hajoava tyyppi MSA-uutolla sekä maasta ja kasvien juurista totaalfenolit ja kondensoituneet tanniinit.</p> <p>Kiintoaineksen kokonaistyyppipitoisuus oli kontrollimaassa korkein ja C/N-suhde oli odotusten mukaisesti matalin kontrollimaassa. Kontrollimaassa olivat suurimmat ammoniumtyppi- ja liukaisen orgaanisen typen pitoisuudet sekä korkein pH. Nitraattityppi jäi kaikissa koejäsenissä alle määritysrajan. Liukoinen aminohappopitoisuus oli korkein mäntymaassa ja varpumaissa matalin. Kondensoituneiden tanniinien ja totaalfenolien pitoisuus oli suurin kanervan ja pienin männyn juurissa. Lisäksi kanervamaassa olivat suurimmat kondensoituneiden tanniinien ja totaalfenolien pitoisuudet.</p> <p>Kasvilajilla oli selkeä vaikutus orgaanisen typen liukoisuuteen maassa. Mänty näytti tehostavan aminohappojen vapautumista orgaanisesta aineksesta mykorritsojensa avulla. Lisäksi varpukasveilla ja männyllä näytti olevan eroavaisuutta orgaanisen typen käytössä. Tulosten perusteella kanerva, puolukka ja mustikka tuottavat enemmän fenolisia yhdisteitä, jotka voivat sitoa typeä vaikeasti hajotettavaan orgaaniseen muotoon mäntyyn verrattuna. Lisäksi varpukasvimaiden matala pH voi olla edesauttavana tekijänä polyfenoli-proteiini-kompleksien syntymisessä ja näin ollen vaikuttaa typen kiertoon metsämaassa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Key words			
Varpukasvi, mänty, tyyppi, metsämaa, orgaaninen kerros			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Maaperä- ja ympäristötieteen osaston käsikirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Ohjaajat: Jussi Heinonsalo ja Sanna Kanerva			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department
Faculty of Agriculture and Forestry		Department of Food and Environmental Sciences
Tekijä/Författare – Author		
Anu Anneli Ahvenainen		
Työn nimi / Arbetets titel – Title		
Effect of dwarf shrub species and pine to the behaviour of nitrogen in organic layer of forest soil		
Oppiaine /Läroämne – Subject		
Environmental Soil Science		
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Master's thesis	April 2017	49 p.
Tiivistelmä/Referat – Abstract		
<p>In boreal forest soils nitrogen is usually the limiting factor of plant growth. In these kinds of environments nitrogen is mostly in organic forms, which is not easily available to plants. Nitrogen can form complexes with some secondary metabolites e.g. tannins, which some plants produce. Mycorrhizas of trees and ground vegetation are an important influence of nitrogen cycling in forest ecosystems. Their function help plants to use organic nitrogen as a nitrogen source. With this way these plants will get an advantage in nutrient competition.</p> <p>The aim of this study was to compare effects of different plant species: heather (<i>Calluna vulgaris</i>), blueberry (<i>Vaccinium myrtillus</i>), lingonberry (<i>Vaccinium vitis-idaea</i>) and pine (<i>Pinus sylvestris</i>) and a control soil without plants on nitrogen's behaviour in organic layer of forest soil. Studied plants were growing in microcosms. The soil analyses were organic matter with loss on ignition, pH, mineral nitrogen and dissolved amino acids with microplate method, total carbon and nitrogen and C/N-ratio, dissolved organic carbon and dissolved nitrogen. In addition, soil hydrolysable and recalcitrant nitrogen was analysed with MSA-extraction and total phenols and condensed tannins was studied from soil and plant roots.</p> <p>Total nitrogen content was highest and C/N-ratio was lowest in control soil as it was expected. The control soil had the highest $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and dissolved organic N concentrations and the highest pH. $\text{NO}_3^-\text{-N}$ was under limit of detection in all soils studied. The dissolved amino acid concentration was highest in pine soil, whereas in the dwarf shrub soils it was lowest. The total phenol and condensed tannins concentrations were highest in heather roots, while in pine roots there were lowest. In addition, heather soil had the highest concentrations of total phenols and condensed tannins.</p> <p>The plants had great influence to organic nitrogen to change in a dissolved form in soil. The mycorrhizas of pine were likely to degrade organic matter to dissolved amino acids. In addition, the dwarf shrub species seemed to have different way to use organic nitrogen compared to pine. Based on the results of this study, heather, blueberry and lingonberry produced more phenolic compounds, which are able to transform nitrogen in a recalcitrant organic form in soil, compared to pine. Furthermore, the low soil pH caused by dwarf shrub species, can intense the formation of polyphenol-protein-complexes in soil. Thus, this can affect the nitrogen cycling in forest soil.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Key words		
Dwarf shrub, pine, nitrogen, forest soil, organic layer		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited		
Division of Environmental Soil Science		
Muuta tietoa – Övriga uppgifter – Additional information		
Instructors: Jussi Heinonsalo and Sanna Kanerva		

Sisällysluettelo

1 Johdanto	7
2 Kirjallisuuskatsaus	8
2.1 Maan orgaaninen aines	8
2.1.1 Humus.....	8
2.1.2 Orgaanisen aineksen laatu ja hajoaminen maassa	9
2.2 Maaperän tyyppi	10
2.2.1 Biologinen typensidonta	11
2.2.2 Maan orgaaninen typpipooli.....	11
2.2.3 Typen mineralisaatio ja nitrifikaatio	12
2.2.4 Denitrifikaatio	13
2.2.5 Typen hävikit maassa	14
2.3 Kasvien fenoliset yhdisteet	15
2.3.1 Fenolisten yhdisteiden syntyminen kasvissa	16
2.3.2 Fenoliset yhdisteet kasveissa	17
2.3.3 Fenoliset yhdisteet maassa	18
2.3.4 Polyfenolien merkitys typen kierrossa	19
2.4 Mykorritsat	21
2.4.1 Mykorritsojen ja valkolahottajien tuottamat entsyymit.....	21
2.5 Työn tarkoitus ja tutkimushypoteesit.....	22
3 Aineisto ja menetelmät	23
3.1 Koejärjestely	23
3.2 Kemiaalliset analyysit	26
3.2.1 Maan pH ja orgaaninen aines	26
3.2.2 MSA-uutto	26
3.2.3 Kuoppalevyanalyysit ($\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, liukoiset aminohapot).....	27
3.2.4 TOC- ja TN-analyysit sekä kiintoaineksen kokonaishiili, -typpi ja C/N-suhde..	29

3.2.5 Kondensoituneet tanniinit	30
3.2.6 Totaalifenolit	31
3.3 Laadunvalvonta ja tilastolliset testaukset	33
4 Tulokset.....	33
4.1 pH, orgaanisen aineksen pitoisuus ja C/N-suhde	33
4.2 Kokonaistyyppi, liukoinen orgaaninen typpi, mineraali-N ja liukoiset aminohapot..	34
4.3 Hydrolysoituva ja vaikeasti hajoava typpi.....	35
4.4 Maan totaalifenolit ja kondensoituneet tanniinit	36
4.5 Juurten totaalifenolit ja kondensoituneet tanniinit	38
5 Tulosten tarkastelu	40
6 Johtopäätökset	43
Viitteet	43

1 Johdanto

Typpi (N) on tärkeä makroravinne sekä maaperässä että vesistöissä. Typellä on monia eri hapetusasteita, minkä seurauksena se voi esiintyä erilaisina liukoisina tai kaasumaisina yhdisteinä. Kaasumaisena se esiintyy molekulaarisena typpenä (N_2) ja typen oksideina (NO_x), kuten dityppioksidina (N_2O), joka on myös kasvihuonekaasu. Liukoisena se esiintyy mineraalimuodoissa ammonium- (NH_4^+) ja nitraattityppenä (NO_3^-) sekä liukoisena orgaanisena typpenä (dissolved organic nitrogen, DON). Suurin osa maaperän typpipoolista on orgaanisessa muodossa ja useimmissa pintamaissa orgaanisen typen osuus on yli 90 % (Stevenson 1982, s. 55).

Kasvit käyttävät typpeä rakennusaineenaan muun muassa nukleotidien, aminohappojen ja proteiinien valmistuksessa. Kasvit ottavat typen pääasiassa mineraalityppenä, mutta pystyvät myös hyödyntämään orgaanisia typenlähteitä, kuten aminohappoja (Persson ja Näsholm 2001). Kuitenkin suurimmaksi osaksi typpi on maaperässä sellaisessa orgaanisessa muodossa, jolloin se ei ole kasveille helposti käyttökelpoista. Borealisissa havumetsissä typpi onkin usein kasvien kasvua rajoittavana tekijänä. Sopeutuminen kasvupaikan karuihin oloihin ja kilpailu ravinteista ohjaa kasveja muodostamaan kemiallisesti reaktiivisia orgaanisia yhdisteitä, jotka saattavat auttaa niitä ravinteista kilpailtaessa (Northup ym. 1995a) ja hyödyntämään mykorritsoja (Bending ja Read 1996a). Metsämaissa typen sisäinen kierto voi tällöin muuttua kasvien tuottamien sekundaaristen metaboliatuotteiden myötä, jotka voivat kompleksoida muun muassa proteiineja (Kuiters 1990, Kraus ym. 2003b, Adamczyk ym. 2011).

Tässä tutkimuksessa selvitettiin kolmen varpukasvilajin ja männyn vaikutusta typen käyttäytymiseen metsämaan orgaanisessa kerroksessa. Kemiallisilla analyyseillä selvitettiin muun muassa kasvilajien vaikutusta orgaanisen typen käyttökelpoisuuteen ja arvioitiin kasvilajien tuottamien sekundaaristen metaboliatuotteiden merkitystä metsämaan typen kierrossa.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Maan orgaaninen aines

Maaperän kiinteä faasi koostuu peruskalliosta rapautuneesta kivennäisaineksesta sekä orgaanisesta aineksesta, joka on kuollutta eri hajoamisasteilla olevaa kasvi- ja eläinainesta, mikrobi-biomassaa sekä humusta eli humifioitumisprosessin läpikäynyttä orgaanista ainesta. Tuoreesta orgaanisesta aineksesta vapautuu ravinteita ja hiiltä mineralisaatiossa, jolloin suurin osa orgaanisesta hiilestä vapautuu hiilidioksidina mikrobien hengityksen kautta (Tipping 2002, s. 10). Mineralisaatio on harvoin täydellistä, joten osa orgaanisesta aineksesta muuntaa muotoaan erilaisten biologisten ja kemiallisten prosessien myötä ja muuntuu amorfiseksi ainekseksi, jonka alkuperää ei voi enää tunnistaa. Tämän humifioitumisprosessin myötä maassa syntyy heterogeenisiä humusyhdisteitä, joiden ominaisuudet riippuvat siitä, millaisia reaktioita ne ovat käyneet läpi muodostumisvaiheessa.

2.1.1 Humus

Humus on rakenteeltaan monimutkainen orgaaninen aine ja sen syntymekanismeista on olemassa erilaisia teorioita, kuten ligniini- ja polyfenoliteoria (Tipping 2002, s. 11). Humus jaetaan liukoisuuden mukaan kolmeen luokkaan: fulvohapot, humushapot ja humiini (Tipping 2002, s. 6). Fulvohapot liukenevat sekä happoon että emäkseen ja ovat molekyylikooltaan pienin humusfraktio. Humushapot liukenevat emäkseen ja saostuvat happamassa pH:ssa. Humiini on stabiilein humusfraktio ja se ei liukene happoon eikä emäkseen. Humushapot ja humiini ovat enimmäkseen osana maan kiintoainesta, kun taas fulvohapot ovat liikkuvampi humusfraktio. Mikrobien on vaikea hajottaa humusyhdisteitä niiden monimutkaisen rakenteen ja voimakkaan pidätystaipumuksen vuoksi maan kiintoainekseen.

Humusyhdisteet eroavat liukoisuuden ja molekyylipainon lisäksi funktionaalisilta ryhmiltään ja alkuainekoostumukseltaan. Fulvohapot sisältävät enemmän karboksyyli-, hydroksyyli- ja karbonyyliryhmiä verrattuna humushappoihin, kun taas humushapoissa ja humiinissa on enemmän hiiltä ja typpeä verrattuna fulvohappoihin (Stevenson 1982, s. 221, 235). Eri humusfraktioiden kehittyminen maassa poikkeaa toisistaan myös ajallisesti (Rice 2001). Humusyhdisteet ovat reaktiivisia metallien, heikosti kiteytyneiden metallioksidien, savimineraalien sekä orgaanisten yhdisteiden, kuten torjunta-aineiden kanssa (Stevenson 1982, s. 17–21). Humuksella on

myös maan rakennetta parantava vaikutus sekä hyvä vedenpidätyskyky. Lisäksi humus toimii maassa ravinnevarastona ja lisää hapon puskurointikykyä.

2.1.2 Orgaanisen aineksen laatu ja hajoaminen maassa

Tärkeä orgaanisen aineksen hajoamiseen ja laatuun vaikuttava tekijä on lähtöaineen ravinteikkuus. Karikkeen määrä ja laatu riippuvat muun muassa kasvillisuudesta, ilmastosta, topografiasta ja maan käyttötavasta (Stevenson 1982, s. 22). Luonnontilaiseen metsämaahan ei yleensä kohdistu paljon maan muokkausta tai kemikaalien lisäämistä suoraan ihmisen toimesta, joten metsäekosysteemeissä maan orgaanisen aineksen laatu on pitkälti riippuvainen puulajien ja aluskasvien karikkeesta, josta se muodostuu. Maan orgaanisen aineksen laatu muuntuu ajallisesti, sillä tuore karike on kemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaista verrattuna ikääntyneempään ja osittain hajonneeseen karikkeeseen (Berg 2000).

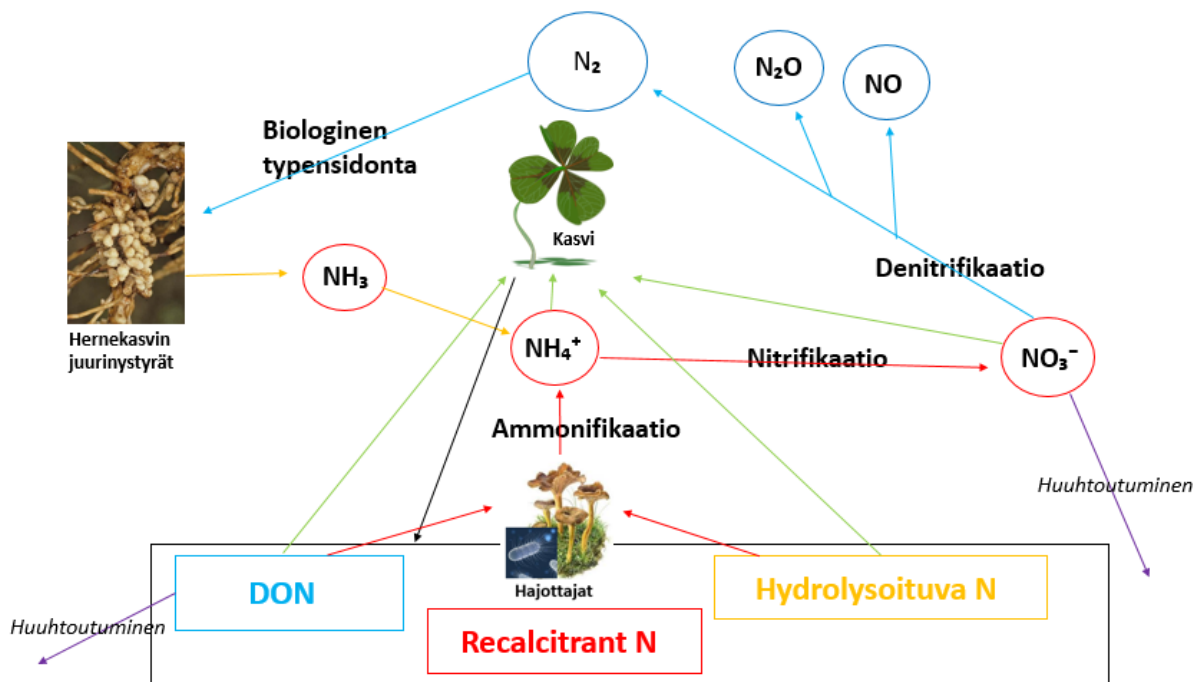
Maan C/N-suhde on tärkeä parametri kuvaamaan orgaanisen aineksen laatua ja hajoamisen tilaa. C/N-suhteen ollessa matala, on orgaanisessa aineksessa tyypeä ylimäärä mikrobien omaan tarpeeseen nähtynä. Tällöin ylimääräinen tyyppi mineralisoituu eli muuntuu epäorgaanisiksi liukoiksi typen muodoiksi ja on helposti kasvien käytettävissä. Yleissääntönä on, että kolmannes maahan päätyvästä tuoreesta orgaanisesta aineksesta jää sinne osaksi mikrobibiomassaa (Stevenson 1982, s.115). Suurin osa poistuu maasta hiilidioksina maaeläinten ja mikrobien hajotustoiminnan seurauksena. Maan humuskerroksessa C/N-suhde on yleensä mineraalimaakerrosta korkeampi.

Monet lehtipuut (esimerkiksi saarni, lehmus ja vaahtera) muodostavat runsaasti tyypeä sisältävää kariketta (Vesterdal ym. 2008). Ravinnepitoinen karike hajoaa nopeasti, koska sen sisältämät orgaaniset yhdisteet ovat helposti mikrobien hajotettavissa (Kuiters 1990). Berg (2000) kuitenkin mainitsee, että karikkeen hajoamisen myöhemmässä vaiheessa suuri typpipitoisuus voi hidastaa ligniinin hajoamista. Havupuiden (esimerkiksi kuusi) tuottama karike on vähemmän typpipitoista (Vesterdal ym. 2008). Lisäksi havupuiden hapan karike laskee mikrobiaktiivisuutta, joten karike hajoaa hitaasti (Kuiters 1990). Eri puulajit siis muodostavat erityyppistä humusta, jossa biologinen aktiivisuus ja ravinteiden saatavuus on erilaisia. Myös kasvien tuottamien fenolisten yhdisteiden määrä ja laatu vaikuttavat metsämaan orgaanisen aineksen ominaisuuksiin (Kanerva ym. 2008).

2.2 Maaperän typpi

Typeä päätyy maaekosysteemiin pääasiassa biologisen typensidonnan ja ihmisen vaikutuksesta typpilannoitteiden kautta (Stevenson ja Cole 1999, s. 207). Suomalaisessa havupuuvaltaisessa metsämaassa typpi on yleensä kasvien kasvua rajoittavana tekijänä, sillä metsämaata ei lannoiteta kuten viljelymaata. Metsämaassa typen kierto on viljelymaahan verrattuna usein hitaampaa ja orgaanisen aineksen laatu korostuu typen käyttökelpoisuudessa. Suomalaiseen mäntymetsään kerääntyvän totaalityppimäärän on vuositason laskettu olevan 7 kg N/hehtaari, josta suurin osa maahan päätyy ilmalaskeumana (Korhonen ym. 2013).

Typen kiertoon liittyvät prosessit ovat pääosin mikrobiologisia. Mikrobin toimintaan vaikuttavat taas abioottiset tekijät kuten maan redox-potentiaali eli hapetus-pelkistys-potentiaali, pH ja lämpötila. Nämä parametrit määräävät sen, mitkä mikrobit milloinkin toimivat maassa tehokkaimmin. Eri prosessit voivat kuitenkin toimia samanaikaisesti maassa. Kuvassa 1 on esitetty yksinkertainen kaavio typen kiertoon liittyvistä pääprosesseista ja typen liikkumisesta maaperässä.



Kuva 1. Typen kiertoon liittyvät pääprosessit ja typen liikkuminen. Mustan laatikon sisään on koottu orgaanisen typen pooleja: liukoinen orgaaninen typpi (dissolved organic nitrogen, DON), hapolla hydrolysoituva orgaaninen typpi ja kestävä, hapolla hydrolysoimaton orgaaninen typpi (recalcitrant N).

2.2.1 Biologinen typensidonta

Biologisessa typensidonnassa tietyt mikrobilajit sitovat ilmakehän molekulaarista typpeä (N₂). Mikrobit voivat olla vapaasti eläviä (esimerkiksi *Azotobacter*) tai elää symbioosissa kasvien kanssa (esimerkiksi *Rhizobium*, *Frankia*) (Madigan ym. 2012, s. 732, 756). Typensidonnassa molekulaarinen typpi pelkistyy ammoniakiksi nitrogeenaasientsyymin vaikutuksesta reaktioyhtälön 1 mukaisesti:



Tämän jälkeen typpi on assimiloitavissa osaksi mikrobin biomassaa kuten aminohapoiksi ja nukleotideiksi (Madigan ym. 2012, s. 391). Typpeä sitovien mikrobien kanssa symbioosissa elävillä kasveilla (typensitojakasvit) on juurinystyröitä, joissa typpeä sitovat mikrobit elävät (Madigan ym. 2012, s.756). Typpiköyhässä maassa typensitojakasveilla kuten hernekasveilla ja lepällä on kilpailuetu typen saannissa muihin kasveihin verrattuna.

2.2.2 Maan orgaaninen typpipooli

Valtaosa maan tpestä esiintyy orgaanisessa muodossa ja orgaaniset typpiyhdisteet ovat hyvin heterogeenisiä. Suuri osa maan typpipoolista on liukoista orgaanista typpeä (dissolved organic nitrogen, DON), joka koostuu muun muassa vapaista aminohapoista ja typpi-polyfenoli-komplekseista (Jones ym. 2004). Vapaat aminohapot ovat pienimolekyyllipainoinen DON-fraktio, jota mikrobit ja kasvit voivat helposti hyödyntää typen otossa. Jones ym. (2004) arvioivat, että tämä on kuitenkin vain pieni osa koko DON-poolista selvittäessään kolmen eri ruohikko maan liukoisen typen pitoisuuksia. Qualls ym. (1991) raportoivatkin, että suurin osa heidän tutkimensa lehtimetsämaan DON:sta oli peräisin humusyhdisteistä ja vesiliukoisista hapoista.

Orgaanisen typen määrää ja laatua voidaan selvittää happohydrolyysillä. Sowden ym. (1977) selvittivät eri ilmastovyöhykkeisiin (arktinen-, viileä-, subtrooppinen- ja trooppinen ilmastovyöhyke) kuuluvien maiden typpipoolet 6 N HCl-hydrolyysillä. Kaikilla ilmastovyöhykkeillä valtaosan tunnistettavasta ja hydrolysoitavissa olevasta orgaanisesta tpestä muodostivat aminohapot ja aminosokerit. Lisäksi löytyi ammoniakkia, joka muodostuu muun muassa amideista ja hydroksiaminohapoista happohydrolyysin seurauksena, mutta voi olla peräisin myös savimateriaalien kerrosväleihin pidättyneestä ammoniumtpestä. Lämpimillä alueilla suurin osa maan

hapolla hajoavasta orgaanisesta tyypestä oli peräisin aminohapoista ja aminosokereista, kun taas viljeillä alueilla $\text{NH}_3\text{-N}$ oli dominoivin tyyppipooli (Sowden ym. 1977). Kuitenkin vain noin 30–50 % maan hydrolysoituvasta tyypestä on tunnistettavissa (Stevenson ja Cole 1999, s.209). Osan hydrolysoituvasta tunnistamattomasta tyypestä (hydrolyzable unknown N, HUN) arvioidaan olevan peräisin arginiinin, histidiinin, lysiinin ja proliinin ei- α -amino-typestä.

Orgaaninen tyyppi, joka ei hydrolysoitu hapolla, on heikosti hajoavaa, stabiilia tyyppiä (recalcitrant N). Stabiilia tyyppiä on noin kolmannes maan orgaanisesta tyyppipoolista ja osa heikosti hajoavasta tyypestä voi olla sidoksissa humusyhdisteisiin (Stevenson ja Cole 1999, s. 209–210). Typen sijoittuminen humusrakenteessa vaikuttaa siihen, kuinka vahvaa sitoutuminen on. Esimerkiksi humuksen aromaattiseen renkaaseen suoraan sitoutunut aminohappo voi olla vaikeammin mikrobien ja kasvien käytettävissä kuin peptidiketjussa oleva aminohappo.

2.2.3 Typen mineralisaatio ja nitrifikaatio

Maan orgaaninen tyyppipooli on jatkuvassa muutoksessa. Maaeläinten ja mikrobien toiminta vapauttaa maan orgaanisesta aineksesta liukoista epäorgaanista tyyppiä (typen mineralisoituminen), joka on myös kasvien käytettävissä olevaa tyyppiä. Yleisesti ajatellaan, että typen mineralisaatio on kasvien typen saannin kannalta tärkeä prosessi maassa.

Ammonifikaatioksi kutsutaan prosessia, jossa mikrobit hajottavat orgaanista tyyppiä kuten nukleotideja ja aminohappoja epäorgaaniseksi ammoniumtypeksi ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) (Madigan ym. 2012, s.732). Kasvit ja mikrobit käyttävät ammoniumtypen nopeasti omien aminohappojensa tuotantoon. Ammonifikaatioon osallistuvat sekä aerobiset että anaerobiset mikrobit (Stevenson ja Cole 1999, s. 193). Sopivissa olosuhteissa ammoniumtyyppi hapettuu nitraattitypeksi (NO_3^-N) eli nitrifioituu. (Madigan ym. 2012, s. 386). Nitrifikaatio on kaksiosainen reaktiosarja, jossa ensin oma bakteerilajinsa (esimerkiksi *Nitrosomonas*) hapettaa ammoniumin nitriitiksi (NO_2^-), minkä jälkeen toinen bakteerilaji (esimerkiksi *Nitrobacter* ja *Nitrospira*) hapettaa nitriitin nitraatiksi. Tasapainotetut osareaktiot 2 ja 3 ovat:



jolloin kokonaisreaktioksi 4 saadaan:



Nitrifikaatio on tehokkainta lämpimässä maassa, jossa vallitsevat aerobiset olosuhteet. Nitrifikaatio riippuu myös maan pH:sta, mutta elinympäristöllä on vaikutusta mikrobien happotoleranssiin. De Boer ym. (1992) vertailivat nitrifikaation tehokkuutta eri syvyyksiltä happamassa metsämaassa. Karikekerroksessa nitrifikaatio näytti olevan optimaalisempaa pH:ssa 6 kuin pH:ssa 4. Samanlaista vaikutusta ei kuitenkaan havaittu multautumis- tai humuskerroksessa. Tutkijat vetivät johtopäätöksen, että luonnostaan happamammissa maakerroksissa on enemmän happoa kestäviä (happotoleranteja) kuin happoa sietäviä nitrifioivia mikrobeja.

Mikrobit käyttävät itse epäorgaanista typpeä omiin elintoimintoihinsa (assimilaatio) eli ne immobilisoivat typpeä maasta. Jos mineraalitypen määrä maassa laskee ajan myötä, on se merkki typen nettoimmobilisaatiosta, kun taas mineraalitypen määrän kasvaessa on kyse nettomineralisaatiosta (Stevenson ja Cole 1999, s. 191). Priha ja Smolander (1999) tutkivat kahden eri metsätyypin (tuottoisa ja vähemmän tuottoisa) eroja muun muassa typen nettomineralisaation ja mikrobiaktiivisuuden suhteen. Valtapuulajina molemmilla kasvupaikoilla oli koivu, mänty tai kuusi ja näytteitä oli sekä humus- että mineraalimaakerroksesta. Vähemmän tuottoisan metsän maassa todettiin olevan matalampi nitrifioivien mikrobien määrä ja aktiivisuus verrattuna tuottoisampaan metsään. Tutkijat arvioivat tämän olevan yhteydessä vähemmän tuottoisan metsämaan korkeaan C/N-suhteeseen.

Orgaanisen aineksen laatu ja vallalla oleva mikrobisto vaikuttavat siihen, paljonko typpeä voi mineralisoitua kasvien käyttöön. Kieloaho ym. (2016) totesivat, että metsämaassa hapettavat entsyymit ovat avaintekijänä typen mineralisoitumisessa orgaanisesta aineksesta. Mineraalitypen määrä on kuitenkin hyvin pieni osuus metsämaan kokonaistyyppivarastosta. Havumetsämaassa vain alle prosentti kokonaistypen määrästä on mineraalityyppinä (Korhonen ym. 2013).

2.2.4 Denitrifikaatio

Denitrifikaatiota tapahtuu pelkistävissä olosuhteissa eli silloin kun maan happitilanne on heikko. Tällöin anaerobit mikrobit käyttävät elektroniakseptorina hapen sijasta nitraattia, jolloin se pelkistyy typpioksidiksi (NO), dityppioksidiksi (N₂O) tai typpikaasuksi ja poistuu

ekosysteemistä (Madigan ym. 2012, s.731). Nitraatti pelkistyy typpikaasuksi reaktioyhtälön 5 mukaisesti:



Denitrifikaatiolla on haitallisia vaikutuksia maaekosysteemiin, sillä prosessissa typpeä poistuu maasta. Tämä voi muun muassa hidastaa kasvien kasvua ja heikentää maaeliöiden toimintatehokkuutta. Lisäksi denitrifikaation lopputuotteilla dityppioksidilla ja typpioksidilla on haitallisia ympäristövaikutuksia. Dityppioksidin hapettuessa fotokemiallisesti muodostuu ilmakehässä typpioksidia, joka reagoi yläilmakehässä otsonin (O_3) kanssa muuttuen typpidioksidiksi (NO_2) (Madigan ym. 2012 s. 732). Otsonin hajoaminen myös lisää auringon haitallisten ultraviolettisäteiden pääsyn maahan. Typpidioksidin reagoidessa edelleen veden ja hapen kanssa, muodostuu typpihappoa (HNO_3), joka päätyy maaperään tai vesistöön kuiva- tai märkälasseuman muodossa. Tällä on ympäristöä happamoittava vaikutus. Lisäksi dityppioksidi toimii kasvihuonekaasuna alailmakehässä.

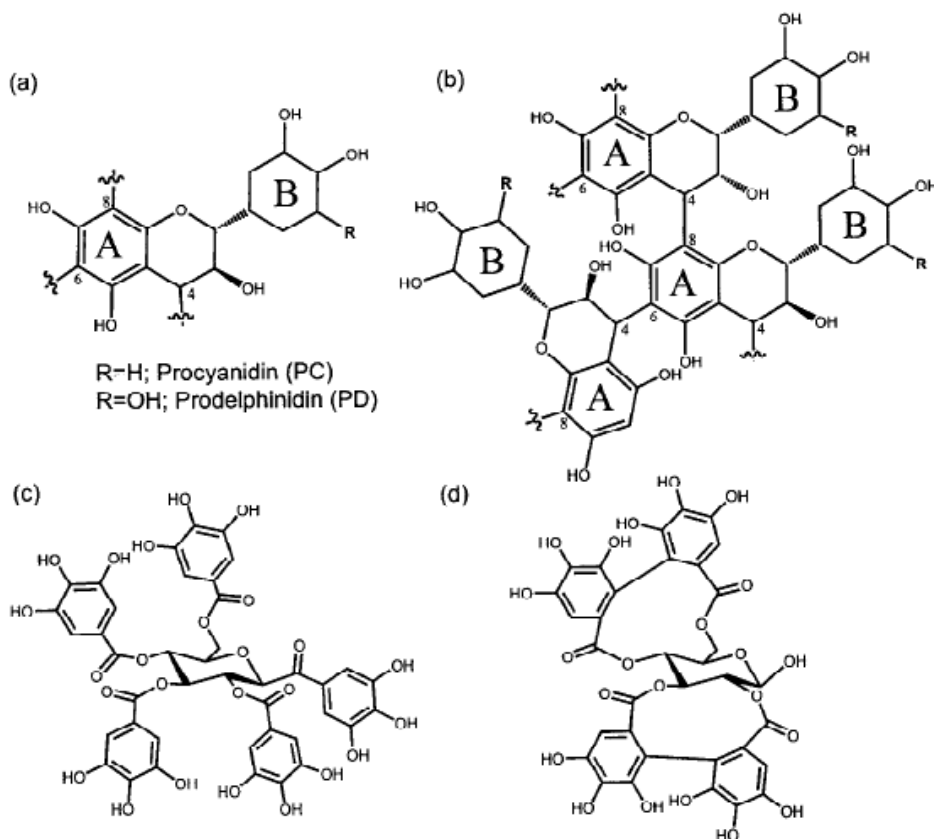
2.2.5 Typen hävikit maassa

Denitrifikaation lisäksi typpeä poistuu maaekosysteemistä nitraatin ja liukoisen orgaanisen typen muodossa. Nitraattityppi on negatiivisesti varautunut vahvan hapon anioni mikä tarkoittaa, että se voi pidäytyä maahan ainoastaan epäspesifisesti. Käytännössä tällaista pidättymistä ei juurikaan tapahdu, joten erityisesti karkeissa maissa nitraatti on herkkä huuhtoutumiselle. Liukoisen orgaanisen typen on todettu olevan paljon suurempi typen hävikkiä aiheuttava typen muoto metsämaassa verrattuna nitraattityppeen (Hedin ym. 1995). Korhosen ym. (2013) tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että suomalaisessa mäntymetsässä typpitappiot denitrifikaation kautta olivat suuremmat kuin typen poishuuhtoutuminen mineraalityypinä tai liukoisena orgaanisena typpenä. Typen pois kulkeutuminen sekä kaasumaisena että liukoisena oli kuitenkin vähäistä. Typpeä voi haihtua pintamaasta myös ammoniakkinä (NH_3) ja haihtuminen lisääntyy typpilannoituksen jälkeen, kun maan pH on yli 7. Tätä tapahtuu kuitenkin lähinnä viljelymaissa.

2.3 Kasvien fenoliset yhdisteet

Kasvit tuottavat erilaisia orgaanisia yhdisteitä, jotka voivat päätyä maaperään kasvin erittämänä sekä kuolleista, hajoavista kasvin osista. Tällaisia ovat esimerkiksi fenoliset yhdisteet. Fenolit ovat aromaattisen renkaan sisältäviä yhdisteitä, joihin on liittynyt hydroksyyli-ryhmä (-OH). Kasveissa fenolit esiintyvät pieninä mono- tai dimeerisinä molekyyleinä tai useamman molekyylin muodostamina polymeereinä, kuten ligniinit ja tanniinit (Keskitalo ym. 2001).

Sekundaarisiksi metaboliatuotteiksi kutsutaan yhdisteitä, joita kasvi tuottaa, mutta ne eivät ole sille ehdottoman välttämättömiä elintoimintojen kannalta. Esimerkiksi kanervakasveilla esiintyy hydrokinoneja, jotka ovat yksinkertaisten fenolien suurin ryhmä (Keskitalo ym. 2001). Flavonoidit taas ovat suuri ryhmä fenoleja, joissa kahta aromaattista rengasta yhdistää kolmihiilinen osa. Kyseiset yhdisteet antavat kasveille muun muassa niiden pigmentin, toimivat hapettumisenestoaineina sekä toimivat kasvin puolustautumiskeinona. Tanniinit ovat veteen liukenevia, keski- tai suurikokoisia (500–3000 Daltonia) polyfenoleja (Kraus ym. 2003b). Ne jaetaan kahteen ryhmään: kondensoituneet ja hydrolysoituvat tanniinit (Kuva 2). Kemiallisesti kondensoituneet tanniinit luokitellaan proantosyanidiineihin, joissa polymeerin flavanolit ovat liittyneet toisiinsa C-C-sidoksin. Hydrolysoituvat tanniinit ovat sokeriosan sisältäviä estereitä ja ne luokitellaan gallo- tai ellagitanniineiksi. Monet puu- ja ruohovartiset kasvit tuottavat tanniineja ja niitä esiintyy kasvien monissa eri osissa, kuten lehdissä ja neulasissa, versossa, juuressa ja kaarnassa (Kraus ym. 2003b). Tanniinien arvioidaan olevan putkilokasveissa neljänneksi suurin orgaaninen yhdisteryhmä selluloosan, hemiselluloosan ja ligniinin jälkeen.



Kuva 2. Kondensoituneen tanniinin monomeeriyksikkö (a) ja trimeeri (b) sekä yksinkertainen gallotanniini (c) ja ellagitanniini (d) (Kraus ym. 2003b).

2.3.1 Fenolisten yhdisteiden syntyminen kasvilla

Jones ja Hartley (1999) kehittivät proteiini-polyfenoli-mallin, jonka avulla he arvioivat polyfenolien määrää ja jakaantumista kasvin lehdissä perustuen biosynteesiin osallistuvien rakennosien metaboliseen alkuperään, biosynteesin esiasteiden vaihtoehtoihin kohtaloihin ja biokemiallisiin säätelymekanismeihin. Hättenschwiler ja Vitousek (2000) havainnollistavat polyfenolien syntymekanismeja kasveissa yksinkertaisella kaaviokuvalla (Kuva 3a). Tunnettu metaboliareitti polyfenolien syntymiseen kasveissa on sikimihapporeitti (shikimic acid pathway). Sen vaikutuksesta syntyy aromaattinen aminohappo fenyylialaniini, joka toimii proteiinien ja fenolisten yhdisteiden esiasteena. Polyfenolien määrää rajoittaa pääasiassa fenyylialaniini ja glukoosi, ja polyfenolien laatuun vaikuttaa kanelihapon (cinnamic acid) määrä. Pienimolekyyllipainoiset fenolit (low molecular weight phenols, LMP) muokkautuvat ja kulkeutuvat kasvista pois nopeammin kuin suurimolekyyllipainoiset proantosyanidiinit (proanthocyanidins, PA), jotka myös kerääntyvät kasviin sen ikääntyessä.

2.3.2 Fenoliset yhdisteet kasveissa

Tanniinien ja totaalfenolien pitoisuudet vaihtelevat eri kasvilajeilla ja kasvin eri osissa. Esimerkiksi kasvin juuresta on mitattu matalampia kondensoituneiden tanniinien pitoisuuksia verrattuna saman kasvin lehtiin (Kraus ym. 2004). Myös tanniiniyhdisteiden tyyppi vaihtelee kasvilajeittain. Esimerkiksi Baldwinin ja Schultzin (1984) tutkimuksessa keltakoivun (*Betula al-legheniensis* Britt.) ja sokerivaahteran (*Acer saccharum* March) lehdet sisälsivät pääasiassa hydrolysoituvia tanniineja (40 % kuivapainosta) ja vain murto-osa oli kondensoituneita tanniineja. Kanervan ym. (2008) mukaan koivu (*Betula pendula* Roth.) ja kuusi (*Picea abies* (L.) Karst.) tuottivat kondensoituneita tanniineja noin kolminkertaisesti mäntyyn (*Pinus sylvestris* L.) verrattuna. Myös metsän aluskasvien totaalfenolipitoisuuksissa löytyi eroja, sillä puolukan (*Vaccinium vitis-idaea* L.) ja mustikan (*Vaccinium myrtillus* L.) lehdissä totaalfenolipitoisuudet olivat huomattavasti korkeammat verrattuna seinäsammaleeseen (*Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt.) ja metsälauhaan (*Deschampsia flexuosa* (L.) Trin.) Suurin osa varpukasvien fenoleista oli suurimolekyyllipainoisia fenoleita (Kanerva ym. 2008).

Kasvin iällä ja erilaisilla ympäristötekijöillä on havaittu olevan vaikutusta polyfenolipitoisuuden kasvissa. Ossipovan ym. (2001) tutkimuksessa vanhemmissa koivun lehdissä kondensoituneiden tanniinien pitoisuus oli huomattavasti korkeampi kuin nuoremmissa lehdissä. Fenolisten yhdisteiden pitoisuus ja laatu muuntuu kasveissa myös vuodenajan mukaan, mikä havaittiin Jalalin ym. (1982) tutkimuksessa. Kanervan totaalfenolipitoisuus oli korkeimmillaan sekä versossa että juuressa kasvukauden aikana, mutta versossa se oli läpi vuoden selvästi korkeampi juureen verrattuna. Keväällä juurien uusiutuessa fenolipitoisuus niissä kasvoi. Jalal ym. (1982) arvelivat myös kanervan sienijuuren toiminnan vaikuttavan juuren fenolituotantoon. Northup ym. (1995a) havaitsivat maan pH:n vaikuttavan polyfenolien tuotantoon havupuiden neulasissa. Tutkijat selvittivät kääpiösyressin (*Cupressus pygmaea*), kontortamännyn (*Pinus contorta* var. bolanderi) ja piispanmännyn (*Pinus muricata*) totaalfenolien, kondensoituneiden tanniinien sekä ravinteiden pitoisuuksia. Puut kasvoivat kasvupaikoilla, joilla oli pH-gradientti (pintamaiden pH 5,0–3,0 ja karikerroksien pH 4,0–2,0). Tulosten mukaan totaalfenoli- ja tanniinipitoisuudet puiden neulasissa olivat sitä suuremmat mitä happamammassa maassa puu kasvoi, kun taas ravinnepitoisuudet laskivat pH:n laskun myötä. Northup ym. (1995a) vetivät johtopäätöksen, että tämä oli kasvien luontainen selviytymiskeino niukkaravinteisessä ekosysteemissä. Tutkijat myös nostivat esiin, että kasvin kyky tuottaa polyfenoleja voi olla sille kilpailuetu muita lajeja vastaan sellaisessa ympäristössä, missä elinolot eivät ole yhtä karut. Kraus ym. (2004) puolestaan esittivät johtopäätöksen, että maan ravinteiden määrällä oli suurempi vaikutus kasvien polyfenolituotantoon kuin maan pH:lla.

2.3.3 Fenoliset yhdisteet maassa

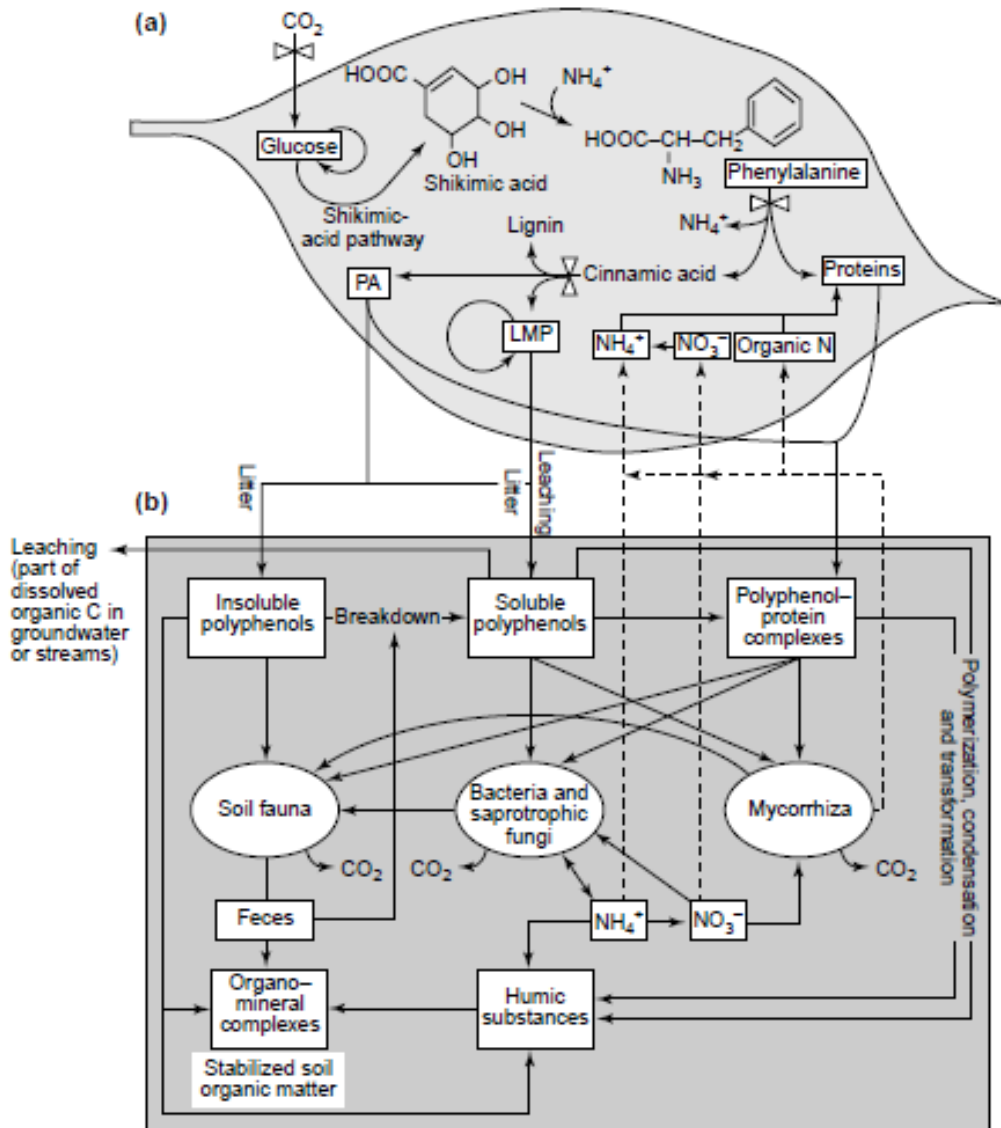
Kuitersin (1990) mukaan, fenolisten yhdisteiden pitoisuuteen maassa vaikuttavat muun muassa maan lajitekoostumus, pH ja orgaanisen aineksen laatu. Lisäksi yhdisteiden pitoisuudet vaihtelevat vuodenaikojen, maan eri kerrosten ja kasvillisuuden mukaan. Yhdisteiden pitoisuus on voimakkaasti riippuvainen siitä, millaista orgaanista ainesta maakerros sisältää. Kanerva ym. (2008) vertasivat metsämaan pintakerroksien (karike-, multautumis- ja humuskerros) fenolisten yhdisteiden pitoisuuksia ja havaitsivat, että korkeimmat totaalfenoli- ($3,8 \text{ g tanniinihappoeqvivalenttia (TAE) kg}^{-1}$ orgaanista ainesta) ja kondensoituneiden tanniinien ($3,5 \text{ g kg}^{-1}$ orgaanista ainesta) pitoisuudet olivat karikkekerroksessa. Yhdisteiden pitoisuudet laskivat maakerroksissa syvemmälle mentäessä. Samalta alueelta ja samoista maakerroksista mitatut hydrolysoituneiden tanniinien pitoisuudet olivat $0,001\text{--}0,017 \text{ g metyyli-gallaattiekvivalenttia (MGE) kg}^{-1}$ orgaanista ainesta, ja korkeimmat pitoisuudet mitattiin humuskerroksesta (Adamczyk ym. 2008). Mineraalimaassa tanniinipitoisuudet ovat huomattavasti matalampia verrattuna maan orgaaniseen kerrokseen (Kraus ym. 2003b).

Krausin ym. (2003b) mukaan tanniinit voivat muun muassa lisätä maan mikrobiaktiivisuutta, osallistua karikkeen hajoamisprosessiin ja humushappojen muodostumiseen, kompleksoida metalleja sekä osallistua typen ja hiilen kiertoon ja maannostumiseen. Kondensoituneiden tanniinien vaikutukset kuitenkin riippuvat niiden molekyylipainosta. Kanerva ym. (2006) tutkivat erikokoisten tanniinifraktioiden vaikutusta muun muassa maahengitykseen ja typen mineralisaatioon. He havaitsivat, että pienimolekyylipainoiset tanniinit lisäsivät mikrobiaktiivisuutta mikä ilmeni maahengityksen lisääntymisenä ja typen assimiloitumisena. Toisaalta suurimolekyylipainoiset tanniinit vähensivät maahengitystä ja lisäsivät typen nettomineralisaatiota. Tutkimustulostensa perusteella Kanerva ym. (2006) tekivät johtopäätelmän, että suuren molekyylipainon omaavilla tanniineilla oli mikrobeille myrkyllisiä vaikutuksia tai ne saostivat typpeä sisältäviä yhdisteitä maasta. Näin ollen pienimolekyylipainoiset tanniinit voivat toimia mikrobeille kasvua edistävänä kun taas suurimolekyylipainoiset kasvua hidastavana tekijänä. Tanniinien reaktiivisuuteen ja esimerkiksi kykyyn kompleksoida proteiineja vaikuttaa myös tanniinien kemiallinen rakenne (Kraus ym. 2003a).

2.3.4 Polyfenolien merkitys typen kierrossa

Kuitersin (1990) mukaan fenoliset yhdisteet vaikuttavat kasvin kasvuun sekä suoraan että epäsuorasti. Suora vaikutus liittyy kasvin aineenvaihduntaprosesseihin ja mykorritsojen toimintaan. Epäsuorat vaikutukset tulevat esiin kasvualustan laadussa orgaanisen aineksen hajoamisen, mineralisaation ja humuksen muodostumisen myötä. Lehtensä pudottavien puiden (esimerkiksi koivu ja poppeli) karikke hajoaa suhteellisen nopeasti, sillä niiden hajotuksessa vapautuvat polyfenoliset yhdisteet eivät muun muassa kompleksoi typpi-yhdisteitä erityisen paljon. Toisaalta tietyt kasvilajit, kuten kuusi, mänty ja kanervakasvit tuottavat hapanta ja ravinneköyhää karikkeainesta, ja kasvien tuottamat tanniinit alentavat mikrobiaktiivisuutta ja hidastavat typen mineralisaatiota.

Kuvassa 3b on esitetty Hättenschwiler ja Vitousekin (2000) havainnollistama yksinkertaistettu kaavio polyfenolien kulkeutumisreiteistä ja kohtalosta maassa. Liukoiset ja vaikealiukoiset polyfenolit päätyvät maahan karikkeen mukana. Liukoiset polyfenolit voivat mineralisoitua heterotrofisten mikrobien ja sienten toimesta, ne voivat muuntua humusyhdisteiksi, muodostaa sidoksia savimineraalien tai heikosti kiteytyneiden oksidien kanssa tai huuhtoutua pois ekosysteemistä. Maaeläimet kuten llerot muokkaavat ja kuljettavat vaikealiukoista polyfenolipitoista karikkeainesta paikasta toiseen, kun taas mikrobit osallistuvat sen kemialliseen muokkaamiseen entsyymiensä avulla. Eliöiden toiminnan seurauksena vaikealiukoiset polyfenolit muuntuvat joko helppoliukoisiksi polyfenoleiksi tai ne edistävät orgaanisen aineksen kompleksoitumista mineraaliaineksen kanssa. Polyfenolit voivat kompleksoitua myös proteiinien kanssa, jolloin proteiinien tyydestä tulee vaikeasti saatavissa olevaa (recalcitrant N) tyyppiä. Polyfenoli-proteiini-kompleksien hajotukseen osallistuvat mykorritsat, lahottajasienet ja bakteerit, jolloin typpi mobilisoituu. Lisäksi maaeläimillä on osuutensa polyfenoli-proteiini-kompleksien kuljetuksessa ja niiden muokkaamisessa. Kompleksien kuljetus ja kemiallinen muuntuminen maassa maaeliöiden ja mikro-organismien toiminnan tuloksena on tärkeässä asemassa ravinteiden kierrossa. Adamczyk ym. (2011) osoittivat, että tanniinit voivat kompleksoida proteiinien lisäksi myös muita typpi-yhdisteitä, kuten aminohappoa (arginiini), aminosokeria (kitiiniä ja kitosaa-nia) ja polyamiineja.



Kuva 3. Yksinkertaistettu kaavio polyfenolien syntymekanismeista kasvissa (a) sekä niiden kulkeutumisesta ja kohtalosta maassa (b) (Hättenschwiler & Vitousek 2000). Polyfenolituotantoa kasvissa säätelevät mekanismit on merkitty tiimalasin muotoisella symbolilla. Yhtenäiset viivat kuvaavat polyfenolien syntymekanismeja sekä niiden virtoja ja muokkautumista kasvissa ja maassa. Katkoviivat kuvaavat kasvin typen ottoa.

Polyfenoli-proteiini-komplekseilla on arveltu olevan suurta merkitystä typen kierrossa erityisesti typpiköyhissä ekosysteemeissä (Leake ja Read 1989, Northup ym. 1995a, Northup ym. 1995b). Typpiyhdisteitä kompleksoivia sekundaarisia metaboliatuotteita tuottavat kasvit voivat monopolisoida typen käytön ja saada kilpailuedun muihin kasveihin nähden, sillä näiden kasvien mykorritsat avustavat kasvia saamaan orgaanisessa muodossa olevaa, polyfenoli-proteiini-komplekseihin sidottua typeä maasta.

2.4 Mykorritsat

Pohjoisen pallonpuoliskon metsämaissa ravinteiden kiertoon osallistuvat puiden ja aluskasvien juurissa elävät symbioottiset mykorritsat eli sienijuuret, jotka käyttävät hyödykseen kasvin tuottamia orgaanisia yhdisteitä (Madigan ym. 2012, s.758). Vastineeksi ne auttavat kasvia saamaan ravinteita sieltä, minne sen oma juuristo ei yllä, mikä on tärkeää etenkin niukkaravinteisissa elinympäristöissä. Kanta- ja kotelosienet muodostavat pintasienijuurisymbioosin (ektomykorritsa, ectomycorrhiza, ECM) puiden, kuten männyn ja kuusen kanssa ja se onkin tärkein sienijuurityyppi suomalaismetsissä (Heinonsalo ja Lehto 2013, s. 196–197). Ektomykorritsa ei läpäise kasvin soluseinää, vaan se muodostaa kuorikerroksen soluväleihin massiivisen rihmaston, Hartigin verkon. Yhtenäisen soluseinän kautta puun juuri ja sienijuuri saavat jaettua ravinteita. Ektomykorritsarihmastot voivat olla pitkiäkin, joten sen kanssa symbioosissa elävä puu saa ravinteita laajalta alueelta.

Yleisin sisäsienijuuriin kuuluva keräsienijuuri eli arbuskelimykorrhiza (arbuscular mycorrhiza, AM) toimii symbioosissa useiden erilaisten kasvilajien kanssa (Heinonsalo ja Lehto 2013, s. 192–193). Valtaosa heinä- ja ruohokasveista sekä monet puuvartiset kasvit, kuten pihlajat ja omenapuut ovat keräsienijuurellisia. Keräsienet muodostavat kerämäisiä rakenteita kasvin soluseinien sisäpuolelle, mutta molempien solukalvot ja soluseinäaineskerros erottavat osakkaita toisistaan. Keräsienet ovat ehdottoman riippuvaisia isäntäkasvista, sillä sieni ei pärjää ilman kasvin tuottamia sokereita. Ilman isäntäkasvia keräsieni on maassa lepotilassa itiönä. Keräsienijuuret avustavat isäntäkasviaan etenkin fosforin otossa maasta. Varpukasveilla, kuten kannerva, puolukka ja mustikka esiintyvä sisäsienijuuriin kuuluva ja kotelosientien muodostama kanervasienijuuri eli erikoidimykorrhiza (ericoid mycorrhiza, ERM) työntyy soluseinän läpi kasvin juuren pintakerroksessa (Heinonsalo ja Lehto 2013, s.193). Sen toiminta helpottaa kasvia saamaan maan orgaaniseen ainekseen sidottua tyypeä niukkaravinteisessa ja happamassa maassa.

2.4.1 Mykorritsojen ja valkolahottajien tuottamat entsyymit

Kompleksi, jossa polyfenoli on sitonut proteiinin, voidaan hajottaa entsyymaattisesti joko peroksidaaseilla, polyfenolioksidaaseilla tai tanniinikarboksyylisteraaseilla (Bending ja Read 1996b). Valkolahottajat ovat puunlahottajasieniä, jotka käyttävät hiilenlähteenään vaikeasti hajotettavia orgaanisia yhdisteitä, kuten ligniiniä. Samalla ligniini muuntuu sellaiseen muotoon,

jota voidaan hyödyntää helpommin mikrobiologisesti. Tähän käytetään fenolioksidaasi-entsyymejä, joita ovat muun muassa lakkaasi sekä ligniini- ja mangaaniperoksidaasi (Eriksson ym. 1990, s. 255–270). Entsyymien vaikutuksesta fenolin hydroksyyli-ryhmän tai aromaattisen aminoryhmän elektroni vapautuu, jolloin kyseinen substraatti muuntuu reaktiiviseksi. Tällä tavoin myös typpeä pääsee vapautumaan helpommin mikrobien hyödynnettäväksi.

Kanervasienujuuret pystyvät hyödyntämään proteiineja hiilen- ja typenlähteenään sekä auttavat isäntäkasviaan saamaan typpeä niukkaravinteisessa ympäristössä. Bajwa ym. (1985) totesivat, että kanervasienujuuri (*Hymenoscyphus ericae*) tuotti entsyymiä, jonka avulla se pystyi hajottamaan proteiineja ravinnekäyttöön. Tämä proteaasi toimi parhaiten suhteellisen matalassa pH:ssa. Bending ja Read (1996a) osoittivat, että kanervasienujuurella oli kyky hajottaa tanniinihappoa ja sienijuuri mahdollisti näin tanniinihapon sitoman typen ja hiilen hyödyntämistä. Sisäsienujuuret voivat myös suojata kasvia esimerkiksi myrkyllisiltä raskasmetallipitoisuuksilta. Bradley ym. (1981) havaitsivat, että kanervasienujuuren ansiosta kanerva pystyi kasvaamaan sinkillä ja kuparilla saastuneilla mailla, sillä metallit eivät päässeet vaurioittamaan kasvin versoa.

2.5 Työn tarkoitus ja tutkimushypoteesit

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää millainen vaikutus varpukasveilla ja männyllä on typen käyttäytymiseen metsämaan orgaanisessa kerroksessa. Mielenkiinnon kohteena oli etenkin orgaanisessa muodossa olevan typen kohtalo ja se onko eri varpukasvilajeilla ja männyllä eroa typpeä kompleksoivien fenolisten yhdisteiden, kuten kondensoituneiden tanniinien pitoisuuksissa. Tutkittavia varpukasveja olivat kanerva (*Calluna vulgaris*), mustikka (*Vaccinium myrtillus*) ja puolukka (*Vaccinium vitis-idaea*). Kontrollikasvina oli mänty (*Pinus sylvestris*). Tämä tutkimus antaa uutta tietoa etenkin varpukasvien osuudesta metsämaan typen kierrossa, sillä tutkimuksia mustikan ja puolukan vaikutuksesta metsämaan typen sisäisen kierron prosesseihin on tehty vähän, jos lainkaan.

Tutkimus tehtiin mikrokosmoskokeena, jossa selvitettiin edellä mainittujen kasvilajien vaikutusta maan orgaanisen aineksen määrään, pH-arvoon, mineraalityppi- ja liukoiseen aminohappopitoisuuteen, kiintoaineen kokonaishiili- ja kokonaistyyppipitoisuuksiin ja C/N-suhteeseen sekä maan liukoisen hiilen ja typen pitoisuuteen. Lisäksi maasta määritettiin hydrolysoituva ja vaikeasti hajoava (recalcitrant) typpi sekä totaalifenolien ja kondensoituneiden tanniinien pitoisuus. Kondensoituneiden tanniinien ja totaalifenolien pitoisuus määritettiin myös kasvien juurinäytteistä.

Tutkimushypoteesit:

- 1) Varpukasvien kondensoituneiden tanniinien ja totaalifenolien pitoisuus on korkeampi sekä kasvissa että maassa verrattuna mäntyyn.
- 2) Kasvilla on vaikutusta maan orgaanisen typen käyttäytymiseen ja liukoisen typen määrät eroavat toisistaan varpukasvi- ja mäntymaissa.

3 Aineisto ja menetelmät

3.1 Koejärjestely

Koejärjestelyn maa oli peräisin Etelä-Suomesta Hyytiälän SMEAR II tutkimusasemalta. Metsän valtapuulajina on mänty (*Pinus sylvestris* L.) ja aluskasveina kasvaa enimmäkseen kanervaa (*Calluna vulgaris*), mustikkaa (*Vaccinium myrtillus*) ja puolukkaa (*Vaccinium vitis-idaea*). Maa on karkealajitteista podsolimaannosta, jossa on 5 cm paksuinen humuskerros. Lisätietoa maan ominaisuuksista on esitetty Ilvesniemen ym. (2000) julkaisussa.

Maa otettiin koejärjestelyä varten humuskerroksesta, jonka jälkeen näkyvät juuret ja mineraalimaa poistettiin, maa homogenisoitiin ja seulottiin 4 mm seulan läpi. Samaa maata käytettiin sekä kasvien siementen idätyksessä että mikrokosmoksessa. Koetta varten kanervan versojen annettiin kehittyä luonnollisesti seulotussa humuksessa. Puolukan ja mustikan marjat kerättiin Hyytiälästä. Marjat pestiin ja kuivattiin ennen pintasterilointia (30 % H₂O₂), jonka jälkeen ne siirrettiin idätysalustoille seulottuun humukseen. Männyn siemenet olivat peräisin jalostuskoelmasta (lot M29-92-0059 Sv. 318 Ullanristi). Männyn siemenet pintasteriloitiin (30 % H₂O₂) ja idätettiin glukoosiagaralustalle (3 g glukoosi, 1,5 g agar / 1000 ml), jolla varmistettiin siementen steriiliys. Viikkoa myöhemmin ne siirrettiin Brown-Wilkins kasvatusputkiin, jossa ne kasvoivat 2,5 kuukautta.

Maa-aines laitettiin 4 mm:n kerroksena mikrokosmokseen (Perspex® microcosms, korkeus 30 cm x leveys 20 cm). Varpukasvien hitaasta kasvusta johtuen taimet siirrettiin mikrokosmokseen noin puoli vuotta niiden kylvöstä. Männyn taimet istutettiin mikrokosmokseen samaan aikaan, jolloin ne olivat 2,5 kuukauden ikäisiä. Mikrokosmokseen istutettiin joko kanervaa (*Calluna vulgaris*), puolukkaa (*Vaccinium vitis-idaea*), mustikkaa (*Vaccinium myrtillus*), mäntyä (*Pinus*

sylvestris) tai ei mitään (kontrolli) (Kuva 4 ja 5). Kutakin koejäsentä oli 14 rinnakkaista (puolukkamaalla 13) ja jokainen rinnakkainen oli omassa mikrokosmoksessaan. Mikrokosmokset asetettiin kasvukammioon pystysuunnassa ja niissä oli läpinäkyvä kansi. Kasvien juuret olivat valolta suojattuna ja maata kasteltiin säännöllisesti sumuttamalla deionisoitua vettä.



Kuva 4. Koejäsenet kasvamassa mikrokosmoksessa. Kuva: Jussi Heinonsalo.



Kuva 5. Kanerva mikrokosmoksessa. Kuva: Jussi Heinonsalo.

Mikrokosmoskoe kesti noin 1,5 vuotta ja se toteutettiin valvotuissa olosuhteissa. Valaistuksella (valon intensiteetti $160\text{--}220 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) pyrittiin jäljittelemään metsän pohjan valaistusta ja lämpötila pidettiin tasaisena (päivä: 18°C / 18 h, yö: 14°C / 6 h). Kolme kuukautta mikrokosmoskokeen aloittamisesta toteutettiin seitsemän viikon pituinen kylmä ja pimeä talvehtimisjakso madaltamalla lämpötilaa ($+5^\circ\text{C}$) ja sammuttamalla keinovalaistus. Tämän jälkeen valaistus ja lämpötila nostettiin vähitellen alkuperäiseen.

Heti kokeen purkamisen jälkeen maasta poistettiin juuret, maa homogenisoitiin ja seulottiin, minkä jälkeen osa maasta pakastettiin (-20°C) ja osa vakuumikuivattiin (Christ LSC plus) ja jauhettiin kuulamyllyllä (2000-230 Geno/Grinder, SpexSample Pred, US, 28 rpm, 30 s.), minkä jälkeen pakastettiin (-80°C). Kasveista eriteltiin kasvin osat (verso, varsi, lehdet, juuret), ne vakuumikuivattiin ja jauhettiin kuulamyllyllä kuten maanäytteetkin, minkä jälkeen pakastettiin (-80°C). Osalle tuoreista maanäytteistä tehtiin 1 M KCl-uutto (uuttosuhde 1:4 w/V) ja

membraanisuodatus (0,45 µm, Pall Life Sciences, Ann Arbor, Michigan, US). Maaauutteita säilytettiin pakkasessa (- 20 °C) typpianalyysijä (ammonium- ja nitraattityppi, liukoiset aminohapot ja TOC/TN) varten.

3.2 Kemiaalliset analyysit

3.2.1 Maan pH ja orgaaninen aines

Maan pH:n ja orgaanisen aineksen määrittämistä varten pakkasessa (- 20 °C) olleet maanäytteet sulatettiin kylmäkaapissa (+ 4 °C) kaksi päivää. Tämän jälkeen niitä kuivattiin lämpökaapissa viikko + 40 °C:ssa ja näytteet olivat eksikaattorissa kunnes analyysi aloitettiin. Analyysissä käytettiin 14 rinnakkaisnäytettä (puolukkamaalla 13).

Maan pH:n määrittämistä varten 15 ml:n falcon-putkiin otettiin noin 2 ml maata ja lisättiin 5 ml mQ-vettä (1:2,5 V/V). Putkia ravisteltiin voimakkaasti (käsin ja vortex) ja jätettiin seisomaan yön yli. Seuraavana päivänä näytteet sekoitettiin (vortex) ja pH mitattiin elektronisella pH-mittarilla (Schott CG 842). Näytteet säilytettiin viileässä (+ 4 °C) 6 päivää.

Orgaaninen aines määritettiin koejäsenistä hehkutushäviön avulla. Falcon-putkien maa-vesi -liete kaadettiin posliiniupokkaisiin vesisuihkupullon avulla. Maa kuivatettiin lämpökaapissa 105 °C:ssa yön yli. Kuiva maa punnittiin ja koejäsenet poltettiin muhveliuunissa (Nabertherm®, Program Controller C19) 500 °C:ssa 3 h. Jäljelle jäänyt tuhka punnittiin. Varpukasvimaiden orgaanisen aineksen pitoisuus on laskettu käyttämällä apuna korjauskerrointa maissa olleen suuren hienojuurimäärän vuoksi. Hienojuuret voivat vääristää orgaanisen aineksen määrää, sillä kaikki juuriaines ei ole välttämättä kuollutta. Korjauskerroin laskettiin vähentämällä juurten massa maan orgaanisen aineksen pitoisuudesta.

3.2.2 MSA-uutto

Hydrolysoituva ja vaikeasti hajotettavissa oleva maan orgaaninen typpi määritettiin Martensin ja Loeffelmannin (2003) esittelemällä ja Olkin ym. (2007) modifioimalla metaanisulfonyyli-happouutolla (MSA-uutto). Menetelmän ideana on fraktioida MSA-hapolla maasta hydrolysoituva typpi (labiili typpi) ja vaikeasti hajoava (recalcitrant) typpi. Vaikeasti hajoava typpi on kasveille ja maan eliöille vaikeasti käytettävissä olevaa tyyppiä. Työssä käytettiin 8 rinnakkaisnäytettä.

Punnittiin 250 mg kylmäkuivattua (Christ LCG, LYO Chamber Guard, Gamma 2-16 LSC, - 21 °C, 0,940 mbar) ja kuulamylyllä (Retsch, MM400, taajuus 1/s: 28, aika: 13 s) hienoksi jauhetua maata Pyrex-putkiin. Lisättiin 2 ml 4 M MSA-happoa (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$), johon oli lisätty tryptamiinia (Aldrich) 2 mg/ml, ja autoklavoitiin (134 °C, 134 kPa) 90 minuuttia. Autoklavoinnin jälkeen maalietteet sekoitettiin (Vortex) ja kaadettiin 15 ml:n Falcon-putkeen (”maa”-putki). Lietteet sentrifugoitiin (Eppendorf AG, Centrifuge 5810R, 20 °C, 4000 rpm, 5 min) ja supernatantti kaadettiin toiseen 15 ml:n Falcon-putkeen (”MSA”-putki). Pyrex-putkiin lisättiin 2 ml ultrapuhdasta mQ-vettä (QPAK®1, Milli-Q Plus, Millipore RiOS™ Ultra-Pure water system) ja sekoitettiin (Vortex). Liete kaadettiin maa-putkiin, sentrifugoitiin (4000 rpm, 5 min) ja supernatantti kaadettiin MSA-putkiin. Vesipesu toistettiin vielä 2 kertaa (yhteensä 3 pesua mQ-vedellä) niin, että kaikki mahdollinen maa-aines saatiin poistettua Pyrex-putkista. MSA-uutteet neutraloitiin 5 M kaliumhydroksidilla (KOH, Sigma-Aldrich, $\geq 85\%$ KOH basis, pastilles), sentrifugoitiin (20 °C, 4000 rpm) 10 minuuttia ja säilytettiin vuorokauden ajan viileässä (+ 4 °C) TOC/TN-analyysiä varten. Lisättiin maa-putkiin 2 ml mQ-vettä, sekoitettiin hyvin (Vortex), sentrifugoitiin (20 °C, 4000 rpm) 5 minuuttia ja kaadettiin supernatantti uuteen falcon-putkeen (H₂O-uute). Maa-putkien pesu tehtiin kahdesti. H₂O-uutteet säilytettiin vuorokauden ajan viileässä (+ 4 °C) TOC/TN-analyysiä varten.

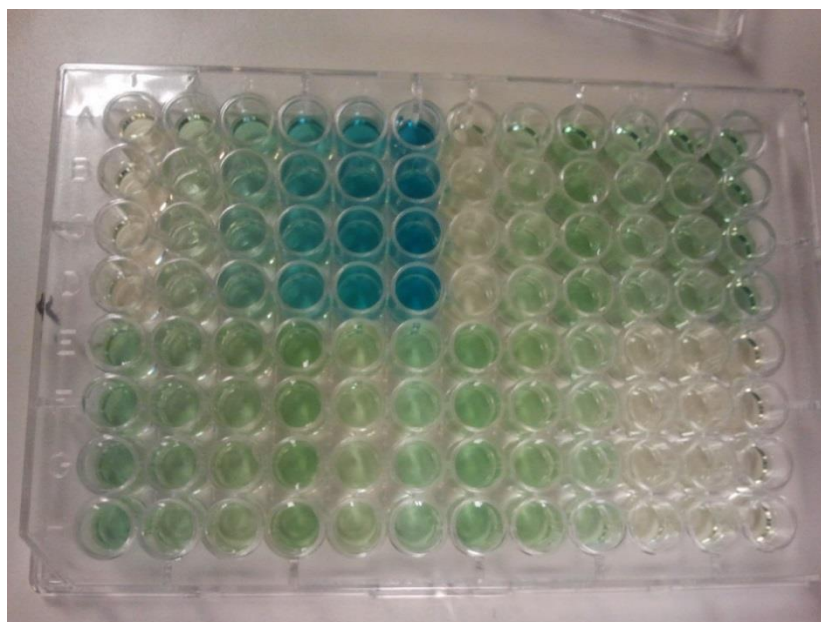
MSA- ja H₂O-uutteet ruiskusuodatettiin 0,45 µm selluloosa asetaatti membraanisudattimen (VWR International) läpi. Uutteet laimennettiin mQ-vedellä 1:22 ja analysoitiin TOC-laitteella (TOC-Vcph/cpn, TNM-1, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Hydrolysoituva typpi laskettiin MSA- ja H₂O-uutteiden liukoisen totaalitypen (TN) summana ja vaikeasti hajoava typpi käsittelemättömän maan kokonaistypen ja hydrolysoituvan typen erotuksena.

3.2.3 Kuoppalevyanalyysit (NH₄⁺-N, NO₃⁻-N, liukoiset aminohapot)

Tuoreet maanäytteet (5 g) oli uutettu 1 M KCl:lla (Sigma-Aldrich, $> 99,5\%$) uuttosuhteella 1:4 (w/V) ravistelemalla tasoravistelijassa (Infors AG CH-4103 BOTTMINGEN, 120 rpm) 80 minuuttia ja sentrifugoimalla (Sigma 3E-1, 1500 rpm) 10 minuuttia, minkä jälkeen imusuodatettiin 0,45 µm asetyyliselluloosa membraanisudattimen (Pall Life Sciences, Ann Arbor, Michigan, US) läpi (Kieloaho ym. 2016). Uutteet oli säilytetty pakkasessa (- 20 °C) 8-10 kuukautta ennen kuoppalevyanalyysien aloittamista. Työssä käytettiin 14 rinnakkaisnäytettä (puolukka-maalla 13) ja mukana oli 10 sokeaa näytettä (2/koejäsen). Sokeat näytteet sisälsivät ainoastaan uuttoliuosta, ja niitä käsiteltiin samalla tavalla kuin varsinaisia näytteitä.

Maan mineraalityppi (NH_4^+ ja NO_3^-) määritettiin KCl-utteista kolorimetrisesti Hood-Nowotnyn ym. (2010) protokollan mukaisesti. Ammoniummäärityksessä käytetty modifioitu indofenolisini-menetelmä perustuu Berthelot reaktioon, jossa NH_4^+ hapettuu natriumhypokloriitin vaikutuksesta ja reagoi fenolin (natriumsalisylaatti) kanssa emäksisessä liuoksessa, jolloin muodostuu vihreä indofenoliyhdiste. Nitraattimääritys perustuu VCl_3 (vanadiinikloridi)/Griess-menetelmään, jossa nitraatti pelkistyy happamassa liuoksessa nitriitiksi vanadiinin (+III) vaikutuksesta.

Ammoniummäärityksessä valmistettiin NH_4^+ -reagenssiliuos liuottamalla natriumsalisylaatti (Sigma) ja natriumnitroprussidi (Merck, Pro analysi) RO-veteen sekä NH_4^+ -valkaisuliuos lisäämällä natriumhypokloriitti-liuos (Sigma-Aldrich) 1,5 M NaOH:iin (Sigma). Koejäsenet, sokeat näytteet ja standardit (NH_4Cl , Sigma) pipetoitiin kirkkaille 96-kuoppaisille kuoppalevyille neljänä mittausrinnakkaisena. Osa näytteistä laimennettiin 1:4 tai 1:10. Lisättiin värinmuodostusreagenssit (NH_4^+ -reagenssiliuos ja NH_4^+ -valkaisuliuos) 8-kanavaisella pipetillä ja inkuboitiin valolta suojattuna huoneenlämmössä 50 minuuttia ennen mittausta. Ammoniumpitoisuudet mitattiin kolorimetrisesti (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Sveitsi, Männedorf) aallonpituudella 655 nm. Kuvassa 6 on esitetty kanervamaa utteet kuoppalevyllä ennen NH_4^+ -N-määritystä.



Kuva 6. Standardit ja kanervamaa utteet NH_4^+ -N-määrityksessä kuoppalevyllä pipetoituna. Kuva: Anu Ahvenainen.

Nitraattimääritystä varten valmistettiin kolmesta liuksesta NO_3^- -työliuos, joka toimi värinmuodostusreagenssina:

1) NO_3^- -Griess1-liuos (NED-liuos): liuotettiin N-1(1-naphthyl)-etyleenidiamiini dihydrokloridi (Fluka) RO-veteen.

2) NO_3^- -Griess2-liuos: liuotettiin sulfanilamidi (Sigma-Aldrich) 3 M HCl:iin (HCl 37 %, Merck, for analysis).

3) NO_3^- -VC₃-liuos: liuotettiin vanadiini(III)kloridi (Aldrich) 1 M HCl:iin.

Mauutteen, sokeat näytteet ja standardit (KNO_3 , Sigma-Aldrich) pipetoitiin kirkkaille 96-kuoppaisille kuoppalevyille neljänä mittausrinnakkaisena. Lisättiin värinmuodostusreagenssi (NO_3^- -työliuos) 8-kanavaisella pipetillä ja inkuboitiin valolta suojattuna + 37 °C:ssa 60 minuuttia ennen mittausta. Nitraattipitoisuudet mitattiin kolorimetrisesti (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Sveitsi, Männedorf) aallonpituudella 540 nm.

Liukoisten aminohappojen määrittämisessä käytettiin Jonesin ym. (2002) esittelemää ja Darrouzet-Nardin ym. (2013) modifioimaa fluoresenssiin perustuvaa kuoppalevymenetelmää. Menetelmässä hyödynnetään OPAME-reagenssia, jossa fluoresenssi syntyy *o*-ptaldialdehydin ja β -merkaptotetanolin reaktiossa primaaristen amiinien (R-NH_2) kanssa. Ammoniumin vaikutus sekä kuoppalevyille pipetoimisen ja levyn lukemiseen kuluva aikaeron synnyttämän vaihtelevuus fluoresenssissa saadaan minimoitua inkuboimalla näytteitä tunnin ajan (Darrouzet-Nardi ym. 2013). Näytteet, sokeat näytteet ja leusiinistandardit (Di-Leucin, Fluka, Puriss) pipetoitiin tummille 96-kuoppaisille kuoppalevyille neljänä mittausrinnakkaisena. Näytteet laimennettiin 1:2 tai 1:5. OPAME-reagenssi lisättiin 8-kanavaisella pipetillä, jonka jälkeen näytteet inkuboituvat valolta suojattuna huoneenlämmössä 60 minuuttia. Lisäksi valmistettiin taustalevyt, joihin pipetoitiin näytteet ja lisättiin 8-kanavaisella pipetillä 0,02 M natriumboraattipuskuri ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, Aldrich, pH 9,5), mutta ei lainkaan OPAME-reagenssia. Inkubointiaika oli sama kuin OPAME-levyissä. Fluoresenssi mitattiin (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Sveitsi, Männedorf) OPAME- ja taustalevyistä aallonpituudella 360–460 nm.

3.2.4 TOC- ja TN-analyysit sekä kiintoaineksen kokonaishiili, -typpi ja C/N-suhde

TOC- ja TN-analyysit tehtiin samoista 1 M KCl-utteista kuin kuoppalevyanalyysit. Analyysia varten utteet laimennettiin mQ-vedellä 1:21 (V/V) ja totaali liukoinen orgaaninen hiili (TOC) ja liukoinen totaalityppi (TN) analysoitiin TOC-laitteella (TOC-Vcph/cpn, TNM-1, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Työssä käytettiin 14 rinnakkaisnäytettä (puolukkamaalla 13) ja 2 sokeaa/koejäsenä. Liukoinen orgaaninen typpi (dissolved organic nitrogen, DON) laskettiin vähentämällä epäorgaaninen typpi liukoisesta totaalitypestä.

Pakkasessa säilytettyjen (- 80 °C), vakuumikuivattujen ja kuulamylyllä jauhettujen maanäytteiden kokonaishiili ja -typpi sekä C/N-suhde mitattiin kuivapolttomenetelmällä (vario MAX CN elementar analyser, ELEMENTAR Analysensysteme, Hanau, Saksa). Työssä käytettiin 14 rinnakkaisnäytettä (puolukkamaalla 13).

3.2.5 Kondensoituneet tanniinit

Kondensoituneet tanniinit analysoitiin sekä maa- että juurinäytteistä Luonnonvarakeskuksen (Luke) tiloissa Vantaalla. Juurinäytteet analysoitiin kuten maanäytteetkin, mutta jauhettuja juurinäytteitä punnittiin analyysiin 100 mg. Maanäytteiden analyysissä käytettiin 14 rinnakkaisnäytettä (puolukkamaalla 13) ja juurinäytteillä 4 rinnakkaista. Analyysissä käytettiin kondensoituneille tanniineille spesifistä happo-butanoli -menetelmää, joka perustuu proantosyanidien hapettumiseen ja siihen perustuvaan värireaktioon (Porter ym. 1986). Standardeihin käytettiin kuusesta (*Picea abies* (L.) Karst) eristettyä kondensoitunutta tanniiniutosta (Adamczyk ym. 2011).

Kylmäkuivattua (Christ LCG, LYO Chamber Guard, Gamma 2-16 LSC, - 21 °C, 0,940 mbar) ja kuulamylyllä (Retsch, MM400, taajuus 1/s: 28, aika: 13 s) hienoksi jauhettua maata punnittiin 250 mg Pyrex-putkiin. Lisättiin 20 ml 70 % asetoni-mQ-vesi -seosta (asetoni: AnalR Normapur, VWR Chemicals prolab, ACS, Reag. Ph. Eur), ravisteltiin hyvin käsin, vortexoitii ja ravisteltiin kouraravistelijassa (Stuart flask shaker SF1, 290 rpm) 60 minuuttia. Tämän jälkeen sentrifugoitiin (Heraeus Instruments, Megafuge 10, 2500 rpm) 10 minuuttia ja supernatantti kaadettiin 100 ml:n dekanterilasiin. Käsittelyt tehtiin näytteille yhteensä 3 kertaa, jolloin dekanterilasissa oli noin 60 ml uutetta. Lopuksi näytteet vietiin haihtumaan lämpökaappiin (+ 50 °C) 1-2 päiväksi, kunnes neste oli kokonaan haihtunut dekanterilasista.

Dekanterilaseihin lisättiin 2 x 2,5 ml mQ-vettä ja sonikoitiin (VWR ultrasonic cleaner) noin 2 minuuttia. Dekanterilasia heiluteltiin käsin, jotta kaikki sakka liukeni veteen. Liennut sakka kaadettiin lasiseen koeputkeen. Sama käsittely tehtiin vielä toisen kerran (yhteensä 10 ml näyteliuosta). Lopuksi näyte sentrifugoitiin (1500–2000 rpm) 10 minuuttia, jotta liuos oli kirkasta. Pipetoitiin supernatantti puhtaaseen lasikoeputkeen. Näytteet säilytettiin yön yli viileässä (+ 4 °C) analyysiä varten.

Valmistettiin happo-butanoli -reagenssi, jossa oli 5 % HCl:a (J. T. Baker, 37–38 %) ja 95 % butanolia (Butan-1-oli, AnalR Normapur, VWR Chemicals Prolabo). Koeputkiin pipetoitiin 700 µl näytettä ja annosteltiin 6 ml happo-butanoli -reagenssia. Koeputkea käännettiin ylös

alas, kunnes liuos oli kirkas. Tämän jälkeen näytteet reagoituivat lämpökaapissa (Heraeus, Thermo Scientific, + 95 °C) 2 h. Näytteet jäähdytettiin vetokaapissa tunnin ajan, minkä jälkeen mitattiin tanniinipitoisuudet spektrofotometrillä (Shimadzu, UV-2401 Pc, UV-VIS Recording Spectrophotometer) aallonpituudella 555 nm.

3.2.6 Totaalifenolit

Totaalifenolit määritettiin sekä maa- että juurinäytteistä Luonnonvarakeskuksen (Luke) tiloissa Vantaalla. Juurinäytteet analysoitiin kuten maanäytteetkin, mutta jauhettuja juurinäytteitä punnittiin analyysiä varten 250 mg. Maanäytteiden analyysissä käytettiin 14 rinnakkaisnäytettä (puolukkamaalla 13) ja juurinäytteillä 4 rinnakkaista. Analyysissä fraktioidaan karkeasti fenolit kokonsa mukaan suuri- ja pienikokoisiin fenoleihin. Suurikokoiset fenolit saostetaan kaseiini-käsittelyllä, jolloin uutteeseen jää jäljelle pienikokoiset fenolit. Totaalifenolipitoisuuden määrittämiseen käytettiin kolorimetrista Folin-Ciocalteu -menetelmää, jossa fenolit ja Folin-Ciocalteu -reagenssi muodostavat värireaktion (Schofield ym. 2001). Maassa ja kasveissa esiintyy hyvin paljon erilaisia fenolisia yhdisteitä, joten kaikkien niiden analysointi erikseen olisi hankalaa. Tämän vuoksi tulokset on ilmoitettu tanniinihappoekvivalentteina (tannic acid equivalent, TAE), sillä se suhteuttaa näytteen fenolipitoisuuden fenoliyhdisteiksi, joita standardina käytetty tanniinihappo sisältää. Menetelmä ei siis ole spesifi.

Kylmäkuivattua (Christ LCG, LYO Chamber Guard, Gamma 2-16 LSC, - 21 °C, 0,940 mbar) ja kuulamyyllyllä (Retsch, MM400, taajuus 1/s: 28, aika: 13 s) hienoksi jauhettua maata punnittiin Teflon-putkiin 500 mg. Lisättiin 20 ml mQ-vettä, sonikoitiin (VWR ultrasonic cleaner) 30 minuuttia ja ravisteltiin kouraravistelijassa (Stuart flask shaker SF1, 290 rpm) 10 minuuttia. Sentrifugoitiin (Oupont Instruments, Sorvall, Superspeed Refrigerated Centrifuge, 10 000 rpm, + 20 °C) 20 minuuttia ja kaadettiin supernatantti Plastex-pulloon (Kuva 7). Uuttovaiheet toistettiin vielä kahdesti (yhteensä maa-uutetta noin 60 ml). Lopuksi uutteen suodatettiin imusuodatuslaitteistolla 1,2 µm lasikuitusuodattimen läpi (VWR, Glass microfibres filter, 693). Valmiit maa-uutteen säilytettiin viileässä (+ 4 °C) analyysiä varten.



Kuva 7. Vesiutteet totaalifenolimääritystä varten. Kuva: Anu Ahvenainen.

Kaseinikäsittelyä varten tyhjiin Teflon-putkiin punnittiin noin 1,0 g kaseiinia (Calbrochem, cat # 218682 Casein, Bovine Milk, carbohydrate and fatty acid free) ja pipetoitiin 30 ml maaauutetta. Ravisteltiin kouraravistelijassa 3 h, jonka jälkeen sentrifugointi (10 000 rpm, + 20 °C) 20 minuuttia ja imusuodatettiin 1,2 µm lasikuitusuodattimen läpi Plastex-pulloon. Kaseinikäsittellyt uutteet säilytettiin viileässä (+ 4 °C) analyysiä varten.

Totaalifenolimääritystä varten valmistettiin standardisarja tanniinihappoliuoksesta (J.T. Baker). Uutteet ja kaseinikäsittellyt uutteet pipetoitiin (2 ml) värinkehitysreaktiota varten muovisiin Falcon-putkiin ja lisättiin reagenssit nopeasti tässä järjestyksessä:

- 1) 1 ml Folin-Ciocalteu -reagenssi (Merck) → sekoitus vortexilla
- 2) 5 ml 20 % natriumkarbonaattiliuos (Na_2CO_3 , Merck) → sekoitus vortexilla
- 3) 2 ml mQ-vettä → sekoitus käsin.

Näytteiden annettiin reagoida huoneenlämmössä 20 minuuttia, jonka jälkeen sentrifugoitiiin (Heraeus Multifuge X3R Centrifuge, Thermo Scientific, 3000 rpm) 3 minuuttia. Totaalifenolipitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzu, UV-2401 Pc, UV-VIS Recording Spectrophotometer) aallonpituudella 735 nm.

3.3 Laadunvalvonta ja tilastolliset testaukset

Maanäytteistä käytettiin 13-14 tai 8 rinnakkaista ja juurinäytteistä 4 rinnakkaista eri analyyseissä. Maan heterogeenisyyden vuoksi suuri rinnakkaisten määrä oli tarpeellinen. Lisäksi kondensoituneita tanniineja analysoidessa mittaus suoritettiin kahdesta mittausrinnakkaisesta ja kuoppalevyanalyyseistä neljästä mittausrinnakkaisesta. Kuoppalevyanalyyseissä sekä TOC- ja TN-mittauksissa oli mukana 2 sokeaa näytettä/koejäsen. Sokeita näytteitä käsiteltiin esikäsittely- ja analyysivaiheessa samalla tavoin kuten varsinaisiakin näytteitä. Sokeilla näytteillä pyrittiin tarkkailemaan mahdollisia epäpuhtauksia esimerkiksi uuttoliuoksessa. Kaikissa analyyseissä käytettiin ultrapuhdasta mQ-vettä. Analyyseissä myös pyrittiin toimimaan aiemmin laaditun protokollan mukaisesti, jos vain mahdollista. Muutamassa analyysissä (MSA-uutto ja kondensoituneet tanniinit) esikäsittely ja määrittäminen käytiin läpi harjoitusnäytteillä. Näin ollen analyysintekijälle tuli selkeämpi kuva työn kulusta.

Tilastolliset testaukset suoritettiin IBM® SPSS®-tilasto-ohjelmalla (versio 22). Yksisuuntaisella varianssianalyysillä (oneway ANOVA) selvitettiin koejäsenten välisiä tilastollisesti merkitseviä eroja. Merkitsevyystasona käytettiin 5 %:a ($p < 0,05$) ja parittaiset vertailut tehtiin Tukeyn testillä. Ennen ANOVA-testausta aineiston normaalijakautuneisuus testattiin Kolmogorov-Smirnovin testillä. Tarvittaessa aineistolle tehtiin logaritmi-muunnos sen saamiseksi normaaliksi jakautuneeksi.

4 Tulokset

4.1 pH, orgaanisen aineksen pitoisuus ja C/N-suhde

Korkein pH oli kontrollimaassa ja ero muihin koejäseniin oli tilastollisesti merkitsevä (Taulukko 1). Matalimmat pH-arvot olivat kanerva- ja mustikkamaalla. Orgaanisen aineksen pitoisuus vaihteli välillä 62,8–65 %. Korkein pitoisuus oli männyllä ja matalimmat pitoisuudet puolukalla ja mustikalla, vaikkakaan tilastollisesti merkitseviä eroja koejäsenten välillä ei ollut. Koejäsenten C/N-suhde vaihteli välillä 25,1–27,6 %. Korkeimmat C/N-suhteet olivat varpukasvimaissa ja matalin kontrollimaassa (Taulukko 1).

Taulukko 1. Maan $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ (lietossuhde 1:2,5), orgaanisen aineksen pitoisuus (%) ja C/N-suhde sekä rinnakkaisnäytteiden ($n=14$) keskiarvon keskivirhe kontrollikäsittelyssä, mäntymaassa, puolukkamaassa, mustikkamaassa ja kanervamaassa. Tilastollisesti merkitsevät erot (Anova, Tukeyn testi, $p < 0,05$) koejäsenten välillä on merkitty eri kirjaimin. Orgaanisen aineksen pitoisuudessa on käytetty kerrointa, joka huomioi varpukasvien juurten aiheuttamaa virhettä.

Koejäsen	pH (H ₂ O)	Orgaaninen aines %	C/N-suhde
Kontrolli	4,49 ^a ± 0,04	64,1 ^a ± 0,5	25,1 ^c ± 0,2
Mänty	4,02 ^b ± 0,08	65,0 ^a ± 0,6	25,9 ^{bc} ± 0,3
Puolukka	3,85 ^{bc} ± 0,06	62,8 ^a ± 0,7	27,2 ^{ab} ± 0,5
Mustikka	3,75 ^c ± 0,03	63,1 ^a ± 0,6	27,6 ^a ± 0,3
Kanerva	3,68 ^c ± 0,03	64,0 ^a ± 0,5	27,2 ^{ab} ± 0,4

4.2 Kokonaistyyppi, liukoinen orgaaninen tyyppi, mineraali-N ja liukoiset aminohapot

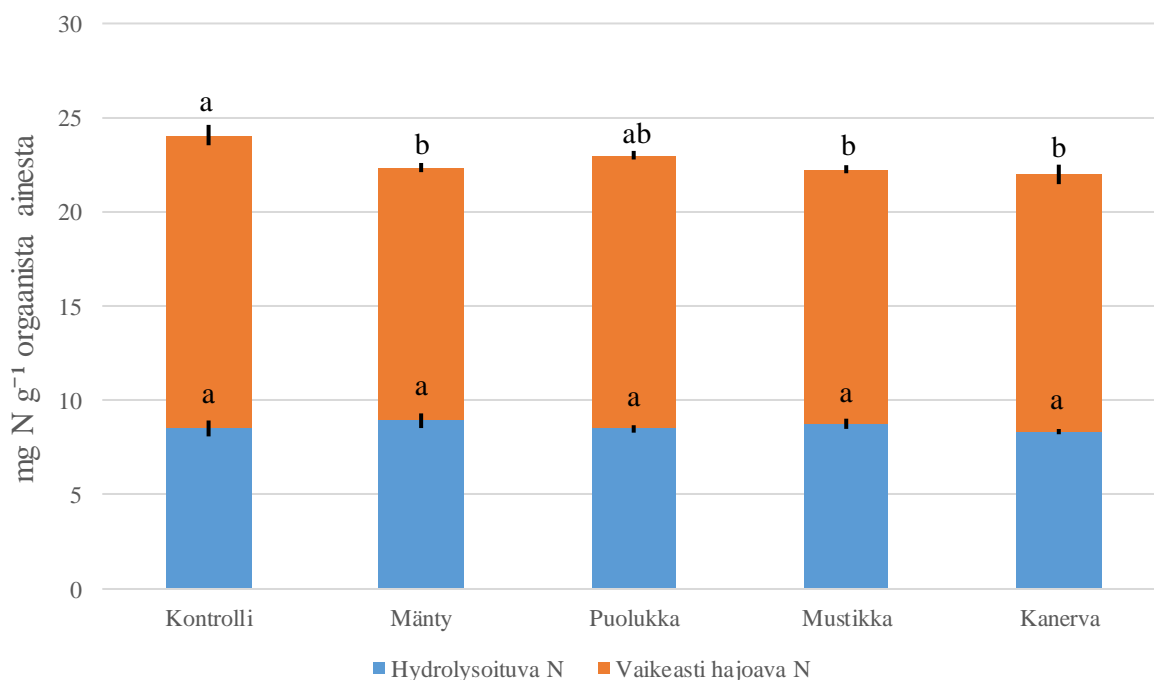
Kiintoaineksen kokonaistypen korkein pitoisuus oli kontrollimaassa ja matalin kanervamaassa (Taulukko 2). Liukoisen orgaanisen typen (DON) pitoisuus oli selvästi suurempi mänty- ja kontrollimaassa kuin varpukasvimaissa, joissa pitoisuudet olivat suunnilleen samansuuruisia (Taulukko 2). Selvästi korkein ammoniumtyyppipitoisuus oli kontrollimaassa. Kanerva- ja mustikkamaassa ammoniumtypen määrä oli hyvin pieni, puolukka- ja mäntymaassa jonkin verran suurempi. Korkein liukoinen aminohappopitoisuus oli mäntymaassa ja matalimmat pitoisuudet varpukasvimaissa (Taulukko 2). Nitraattityyppipitoisuus jäi kaikilla koejäsenillä alle määritysrajan.

Taulukko 2. Kiintoaineksen kokonaistyyppi- (Ntot), liukoinen orgaaninen typpi- (DON), ammoniumtyppi- ja liukoinen aminohappopitoisuus sekä rinnakkaisnäytteiden (n=14) keskiarvon keskivirhe kontrollikäsittelyssä, mäntymaassa, puolukkamaassa, mustikkamaassa ja kanervamaassa. Tilastollisesti merkitsevät erot (Anova, Tukeyn testi, $p < 0,05$) koejäsenten välillä on merkitty eri kirjaimin. Oa=orgaaninen aines.

Koejäsen	Ntot mg g ⁻¹ / oa	DON mg kg ⁻¹	NH ₄ ⁺ -N µg g ⁻¹ / oa	Liukoiset aminohapot µg g ⁻¹ / oa
Kontrolli	24,1 ^a ± 0,2	63,3 ^a ± 4,1	245,7 ^a ± 18,7	10,8 ^b ± 0,6
Mänty	23,0 ^b ± 0,3	64,1 ^a ± 3,6	35,5 ^b ± 13,0	14,0 ^a ± 1,0
Puolukka	23,1 ^{ab} ± 0,3	37,6 ^b ± 3,7	46,7 ^b ± 19,1	8,8 ^{bc} ± 0,3
Mustikka	22,4 ^b ± 0,2	30,5 ^b ± 2,7	4,3 ^c ± 0,8	7,1 ^c ± 0,4
Kanerva	22,1 ^b ± 0,4	35,3 ^b ± 2,1	4,3 ^c ± 0,4	7,2 ^c ± 0,7

4.3 Hydrolysoituva ja vaikeasti hajoava typpi

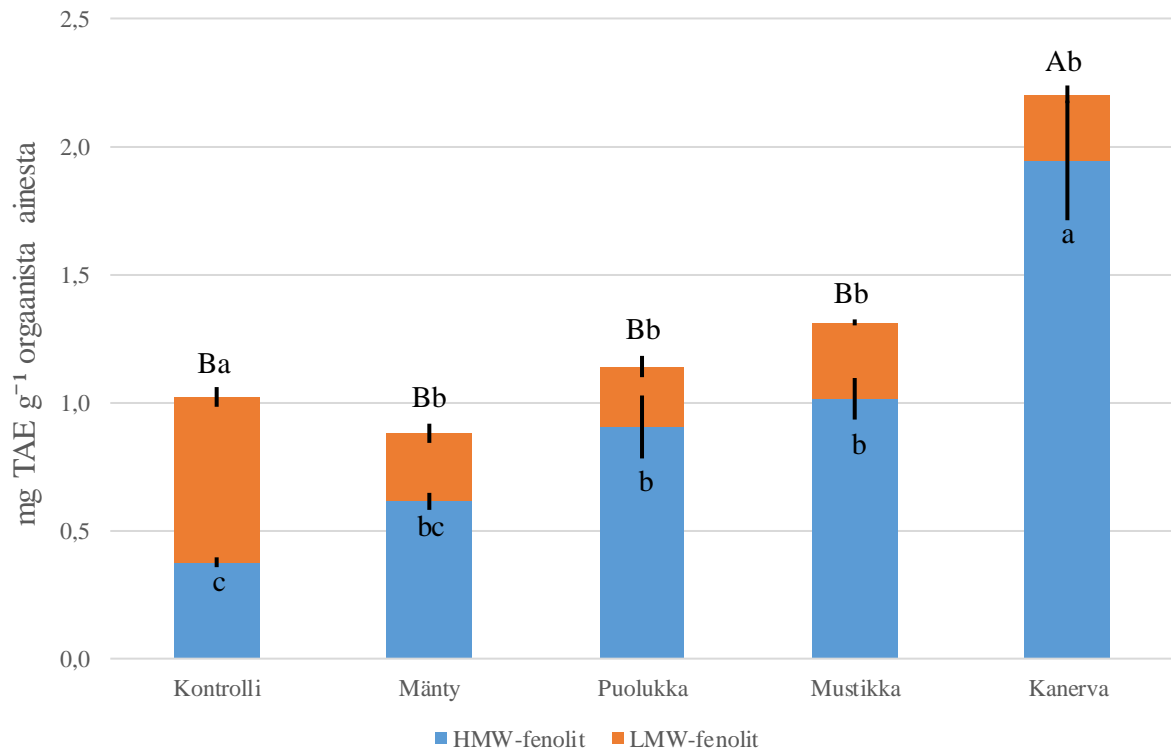
Koejäsenien vaikeasti hajoavan (recalcitrant) typen pitoisuus oli jonkin verran suurempi verrattuna hydrolysoituvaan tyypeen (Kuva 8). Kontrollimaassa vaikeasti hajoavan typen pitoisuus oli suurempi kuin maissa, joissa oli kasvi. Hydrolysoituvan typen pitoisuus oli kaikilla koejäsenillä lähes samansuuruinen.



Kuva 8. Hydrolysoituvan ja vaikeasti hajoavan tyypin pitoisuus (mg N g^{-1} oa) kontrollikäsittelyssä, mäntymaassa, puolukkamaassa, mustikkamaassa ja kanervamaassa. Pylväiden päällä olevat viivat kuvaavat rinnakkaisnäytteiden ($n=8$) keskiarvon keskivirhettä. Tilastollisesti merkitsevät erot (Anova, Tukeyn testi, $p < 0,05$) koejäsenten välillä on merkitty pylväisiin eri kirjaimin.

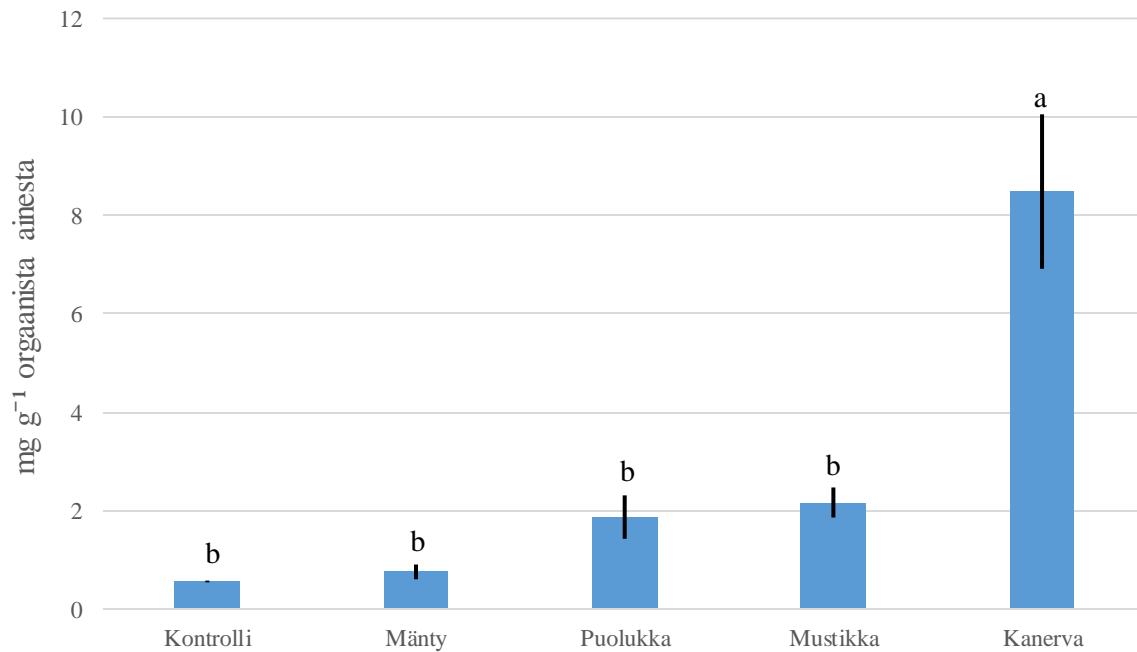
4.4 Maan totaalifenolit ja kondensoituneet tanniinit

Koejäsenten totaalifenolipitoisuus vaihteli välillä $0,9\text{--}2,2 \text{ mg TAE g}^{-1}$ orgaanista ainesta (Kuva 9). Selvästi suurin totaalifenolipitoisuus oli kanervamaassa. Pienimmät pitoisuudet olivat mänty- ja kontrollimaassa, joskaan ero mustikka- ja puolukkamaahan ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Suurimolekyylipainoisia fenoleja löytyi selvästi eniten kanervamaasta. Puolukka- ja mustikkamaassa pitoisuus oli noin puolet verrattuna kanervamaahan ja mäntymaassa noin kolmasosa kanervamaan pitoisuudesta, mutta tilastollisesti merkitsevää eroa puolukka-, mustikka- ja mäntymaan välillä ei ollut. Pienimolekyylipainoisia fenoleja löytyi eniten kontrollimaasta, ja määrä oli yli kaksinkertainen verrattuna muihin koejäseniin. Kasveja kasvaneiden koejäsenten välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa pienimolekyylipainoisten fenolien määrässä. HMW/LMW-fenolien suhde oli kontrollimaassa 0,6, mäntymaassa 2,3, puolukkamaassa 3,8, mustikkamaassa 3,4 ja kanervamaassa 7,5.



Kuva 9. Maan suuri- (HMW) ja pienimolekyyliipainoiset (LMW) fenolit (mg tanniinihappoekvivalenttia g⁻¹ oa) kontrollikäsittelyssä, mäntymaassa, puolukkamaassa, mustikkamaassa ja kanervamaassa. Pylväiden päällä olevat viivat kuvaavat rinnakkaisnäytteiden (n=14) keskiarvon keskivirhettä. Suuri- ja pienimolekyyliipainoisten fenolipitoisuuksien tilastollisesti merkitsevät erot (Anova, Tukeyn testi, $p < 0,05$) koejäsenten välillä on merkitty pylväisiin pienillä kirjaimilla ja totaalifenolipitoisuuksien erot isoilla kirjaimilla.

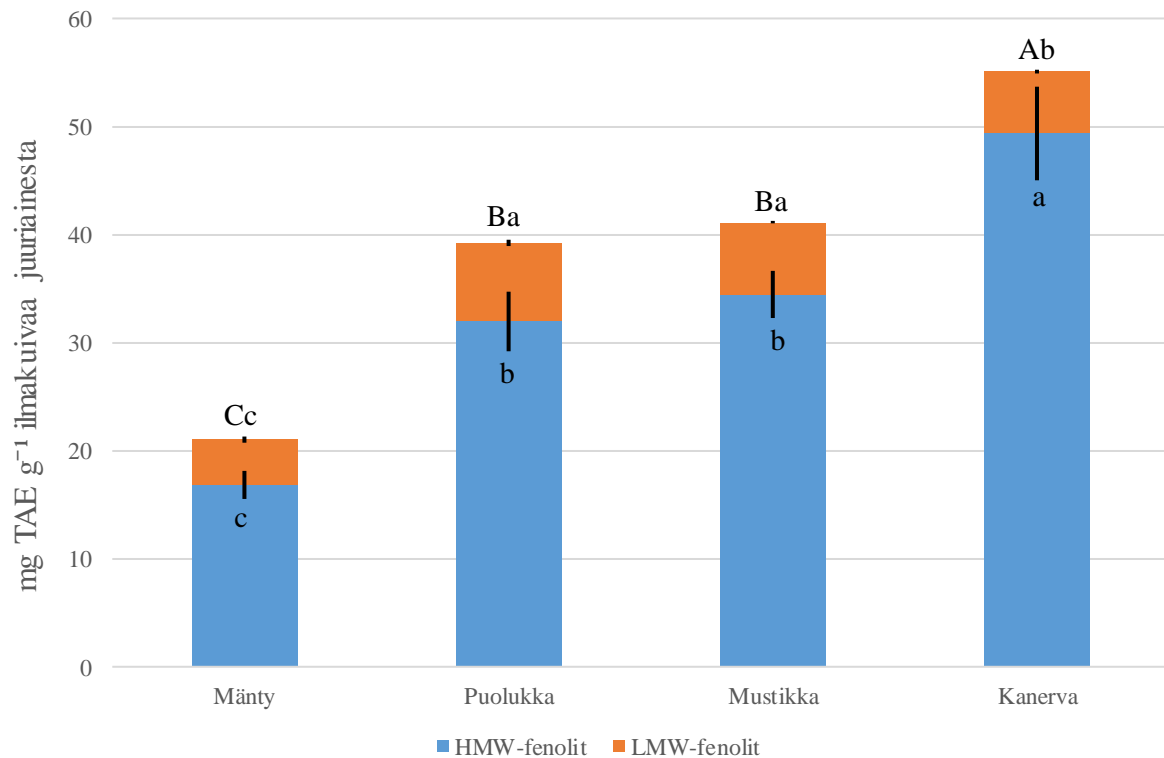
Koejäsenten kondensoituneiden tanniinien pitoisuus vaihteli välillä 0,6–8,5 mg g⁻¹ orgaanista ainesta (Kuva 10). Selvästi korkein pitoisuus oli kanervamaassa, ja ero muihin koejäseniin oli noin 4-8 kertainen. Muiden koejäsenten tanniinipitoisuudet eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi.



Kuva 10. Maan kondensoituneiden tanniinien pitoisuus (mg g⁻¹ oa) kontrollikäsittelyssä, mäntymaassa, puolukkamaassa, mustikkamaassa ja kanervamaassa. Pylväiden päällä olevat viivat kuvaavat rinnakkaisnäytteiden (n=14) keskiarvon keskivirhettä. Tilastollisesti merkitsevät erot (Anova, Tukeyn testi, $p < 0,05$) koejäsenten välillä on merkitty pylväisiin eri kirjaimin.

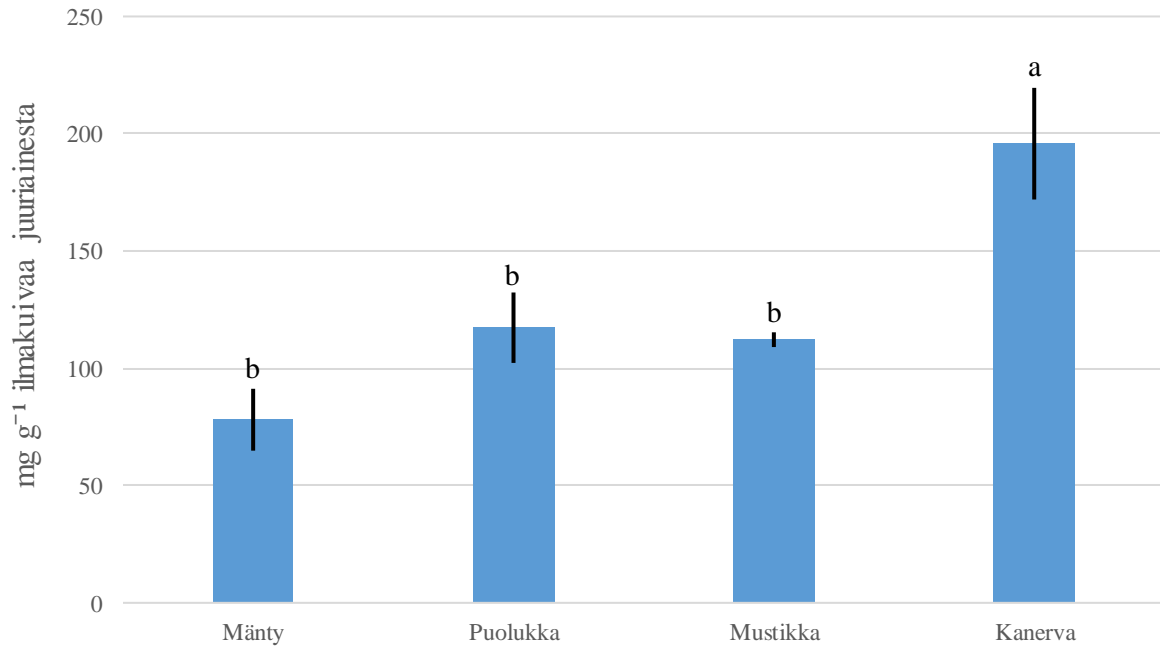
4.5 Juurten totaalfenolit ja kondensoituneet tanniinit

Juurten totaalfenolipitoisuus vaihteli välillä 21–55 mg TAE g⁻¹ ilmakeivää juuriainesta (Kuva 11). Kanervan juurten totaalfenolipitoisuus oli selvästi korkein ja männyn juurten matalin verrattuna muihin koejäseniin. Suurimolekyylipainoisten fenolien pitoisuudet noudattivat samaa trendiä totaalfenolipitoisuuksien kanssa. Pienimolekyylipainoisten fenolien osalta puolukan ja mustikan juurissa olivat suurimmat pitoisuudet ja männyn juurissa pienimmät. Juurten HMW/LMW-fenolien suhde oli männyllä 4,0, puolukalla 4,4, mustikalla 5,1 ja kanervalla 8,6.



Kuva 11. Juurten suuri- (HMW) ja pienimolekyylipainoisten (LMW) fenolien pitoisuudet (mg tanniinihappoekvivalenttia g⁻¹ ilmakeivaa juuriainesta) männyllä (*Pinus sylvestris*), puolukalla (*Vaccinium vitis-idaea*), mustikalla (*Vaccinium myrtillus*) ja kanervalla (*Calluna vulgaris*). Pylväiden päällä olevat viivat kuvaavat rinnakkaisnäytteiden (n=4) keskiarvon keskivirhettä. Suuri- ja pienimolekyylipainoisten fenolipitoisuuksien tilastollisesti merkitsevät erot (Anova, Tukeyn testi, $p < 0,05$) koejäsenten välillä on merkitty pylväisiin pienillä kirjaimilla ja totaalifenolipitoisuuksien erot isoilla kirjaimilla.

Juurten kondensoituneiden tanniinien pitoisuus vaihteli välillä 78–195 mg g⁻¹ ilmakeivaa juuriainesta (Kuva 12). Selvästi korkein pitoisuus oli kanervan juurissa. Matalin tanniinipitoisuus oli männyllä, joskaan se ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi puolukan eikä mustikan juurten pitoisuuksista.



Kuva 12. Juurten kondensoituneiden tanniinien pitoisuus (mg g⁻¹ ilma-kuivaa juuriainesta) männyllä (*Pinus sylvestris*), puolukalla (*Vaccinium vitis-idaea*), mustikalla (*Vaccinium myrtillus*) ja kanervalla (*Calluna vulgaris*). Pylväiden päällä olevat viivat kuvaavat rinnakkaisnäytteiden (n=4) keskiarvon keskivirhettä. Tilastollisesti merkitsevät erot (Anova, Tukeyn testi, $p < 0,05$) koejäsenten välillä on merkitty pylväisin eri kirjaimin.

5 Tulosten tarkastelu

Kasvit vaikuttivat maan typpipitoisuuteen odotusten mukaisesti. Kasvit lasivat kiintoaineksen kokonaistyyppipitoisuutta, mikä vaikutti myös C/N-suhteeseen. Kasvien typen otto maasta laskee typen määrää ja siten kasvattaa C/N-suhdetta. Myös kasvien vaikutus maan mineraalityypen määrään oli selkeä, sillä ammoniumtyypeä löytyi huomattavasti enemmän kontrollimaasta verrattuna kasvillisiin koejäseniin. Tämä oli odotusten mukaista, sillä kasvit ottavat maasta ammoniumtyypeä omiin elintoimintoihinsa. Kanerva- ja mustikkamaassa ammoniumtyypeä oli todella vähän. Kasvit ovat joko käyttäneet tämän typen lähes kokonaan tai maassa ei ole tapahtunut orgaanisen typen mineralisaatiota. Nitraattityppeä ei koejäsenistä löytynyt, mikä on tyypillistä happamalle havumetsämaalle. Koska ammoniumtyppi ei ollut koejäsenissä rajoittavana tekijänä, on maan matala pH todennäköisesti inhiboinut nitrifioivien mikrobien toimintaa. Havupuiden lisäksi myös varpukasvit tuottavat happamia metaboliatuotteita, jotka madaltavat maan pH:ta. Jalal ja Read (1983) vertailivat kanervan ja kuusen tuottamien orgaanisten happojen pitoisuuksia. Tulosten mukaan kanervamaassa oli huomattavasti suurempia aromaattisten happojen pitoisuuksia verrattuna kuusimaahan ja näillä pitoisuuksilla arvioitiin olevan myrkyli-

lisiä vaikutuksia kasveihin ja sieniin. Kanervan tuottamien fenolisten yhdisteiden ja rasvahappojen arvioitiin muokkautuvan mikrobiologisesti orgaanisiksi hapoiksi, jotka lisäävät kanervan kilpailukykyä elintilasta muihin kasveihin verrattuna.

Liukoisia aminohappoja oli eniten mäntymaassa, mikä viittaa siihen, että männyn mykorritsat ja juuriston läheisyydessä elävät mikrobit ovat vapauttaneet orgaaniseen ainekseen sidottua proteiinia ja hajottaneet proteiinit aminohapoiksi entsyymiensä avulla. Myös Kieloaho ym. (2016) saivat samansuuntaisia tuloksia vertaillessaan mäntyä kasvavan ja kasvittoman maan ammoniumtyppi- ja liukoisten aminohappojen pitoisuuksia. Heidän tutkimuksessaan mäntyä kasvavassa maassa liukoisia aminohappoja oli enemmän verrattuna kasvittomaan maahan, kun taas kasvittomassa maassa ammoniumtyppeä oli noin viisinkertainen määrä. Koska ammoniumtypen vähäinen määrä maassa oli kasvin kasvua rajoittava tekijä, painottui typen saatavuus orgaanisesta aineksesta aminohappoina. Näsholm ym. (1998) selvittivät männyn, kuusen, mustikan ja metsälauhan ¹⁵N-leimatun glysiinin ottoa pohjoisen havumetsän kenttäkokeessa. Kyseisistä kasvilajeista mustikka käytti selvästi eniten aminohappoa typenlähteenään, mutta myös metsälauha ja havupuut ottivat sitä tehokkaasti. Näsholmin ym. (1998) tutkimustulos vahvisti hypoteesia, että tietyt kasvilajit voivat ohittaa typen mineralisaation käyttämällä suoraan orgaanista typpeä typenlähteenään. Eri mykorritsatyypeillä voi olla kuitenkin vaikutusta siihen, millaisia orgaanisia typen muotoja kasvi pystyy käyttämään suoraan. Tässä tutkimuksessa liukoiset aminohappopitoisuudet olivat selvästi matalammat varpukasvimaissa verrattuna mäntymaahan. Varpukasvit ovat siis saattaneet hyödyntää aminohappoja mäntyä tehokkaammin maasta. Toisaalta männyn mykorritsat ovat saattaneet tehostaa aminohappojen vapautumista orgaanisesta aineksesta varpukasveja enemmän, minkä vuoksi mäntymaan liukoiset aminohappopitoisuudet olivat varpukasvimaita korkeammat.

Varpukasvien tuottamia kondensoituneita tanniineja ja totaalifenoleja on tutkittu paljon etenkin kanervan osalta (Jalal ym. 1982, Iason ym. 1993, Frutos ym. 2002). Näissä tutkimuksissa on osoitettu kanervan tuottavan paljon näitä sekundaarisia metaboliatuotteita. Tässä tutkimuksessa varpukasvien juurten kondensoituneiden tanniinien ja totaalifenolien pitoisuus oli suurin kanervan juurissa. Lisäksi näitä sekundaarisia metaboliatuotteita löytyi eniten kanervamaasta. Puolukan, mustikan ja männyn juurten kondensoituneiden tanniinien pitoisuudet olivat samansuuruisia. Kuitenkin puolukan ja mustikan juurissa oli suurempi suurimolekyyllipainoisten fenolien pitoisuus kuin männyllä. Puolukalla ja mustikalla saattoi siis olla enemmän esimerkiksi hydrolysoituneita tanniineja mäntyyyn verrattuna.

Liukoisen orgaanisen typen määrään voivat vaikuttaa maassa olevat polyfenolit. Northup ym. (1995b) raportoivat, että maan liukoisen orgaanisen typen määrällä ja polyfenolipitoisuudella

on yhteys. Tämä johtopäätös perustui siihen, että liukoisen polyfenolipitoisuuden kasvaessa myös liukoisen orgaanisen typen määrä lisääntyi maassa. Northupin ym. (1995b) mukaan liukoinen orgaaninen typpi toimii kasville typpivarastona, kun kyseinen ravinne on kasvua rajoittavana tekijänä. Orgaanista typpeä pystyy käyttämään vain kasvin kanssa symbioosin muodostava mykorritsa, jonka ansiosta kasvi saa kilpailuetua typen saatavuuden suhteen muihin kasveihin verrattuna. Toisaalta myös päinvastaisia tuloksia on saatu tanniinien osalta. Kanerva ym. (2006) fraktioivat kuusen ja männyn neulasista tanniineja niiden molekyylipainon mukaan. Tanniinifraktioita lisättiin maanäytteisiin, minkä jälkeen niitä inkuboitiin. Tutkimuksessa havaittiin, että molekyylipainoltaan suurempien tanniinifraktioiden myötä liukoisen orgaanisen typen pitoisuus maassa laski. Kanerva ym. (2006) arvioivat tämän aiheutuvan siitä, että suuri-koiset tanniinifraktiot kompleksoivat proteiineja maasta. Tämä tukee myös tässä työssä saatuja tuloksia, sillä liukoisen orgaanisen typen pitoisuudet olivat kontrolli- ja mäntymaassa selkeästi korkeampia verrattuna varpukasveihin, joissa tanniineja oli enemmän. Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan havaittu olevan korrelaatiota liukoisen orgaanisen typen ja maan kondensoituneiden tanniinien ($r^2 = 0,11$) tai liukoisen orgaanisen typen ja maan totaalifenolien ($r^2 = 0,12$) välillä.

Paitsi fenolien kokonaismäärässä myös niiden jakautumisessa pieni- ja suurimolekyylipainoisiin fraktioihin oli eroavaisuuksia koejäsenten kesken. Kontrollimaassa pienimolekyylipainoiset fenolit dominoivat, mikä on loogista. Koska kontrollimaassa ei ollut kasvia, ei siihen ole kertynyt tuoretta orgaanista ainesta, joka voisi lisätä suurimolekyylipainoisten fenolien määrää. Mielienkiintoista oli se, että männyn juuren HMW/LMW-fenolien suhde (4,0) oli suuri verrattuna mäntymaan HMW/LMW-fenolien suhteeseen (2,3) (Kuva 9 ja 11). Tämä viittaa siihen, että suuri osa männyn juuren suurimolekyylipainoisista fenoleista on hajonnut maassa pienimolekyylipainoisiksi fenoleiksi esimerkiksi männyn mykorritsojen entsyymitoiminnan vaikutuksesta. Myös mäntymaan DON- ja liukoiset aminohappotulokset tukevat tätä oletusta, sillä osa maan liukoisesta orgaanisesta tyypestä voi olla kompleksoituneena pienimolekyylipainoisissa fenoleihin. Tällöin mikrobit voivat hajottaa niitä helpommin aminohapoiksi. Mustikan HMW/LMW-fenolien suhteen muutos juuresta maahan oli samanlainen kuin männyllä. Kanervalla ja puolukalla HMW/LMW-fenolien suhteen muutos oli pienempi verrattuna mäntyyn ja mustikkaan. Tämä saattaa viitata siihen, että kanerva ja puolukka voivat käyttää typenlähteenään myös suurimolekyylipainoisten fenolien (esimerkiksi tanniinien) kompleksoimaa typpeä.

6 Johtopäätökset

Tässä tutkimuksessa vertailtiin varpukasvien (kanerva, puolukka, mustikka) ja männyn vaikutusta typen käyttäytymiseen metsämaan orgaanisessa kerroksessa. Tutkimuksen tulokset antavat lisätietoa kasvien roolista metsämaan typen sisäisessä kierrossa. Selkeitä eroja kasvilajien välillä löytyi sekundaaristen metaboliatuotteiden esiintymisessä niin kasveissa kuin maassakin. Kanerva, puolukka ja mustikka tuottavat tämän tutkimuksen mukaan mäntyyn verrattuna enemmän fenolisia yhdisteitä, jotka voivat sitoa typpeä vaikeasti hajotettavaan orgaaniseen muotoon. Varpukasvimaiden matala pH voi vaikuttaa myös typen kemiallisiin reaktioihin maassa ja näin ollen olla edesauttavana tekijänä polyfenoli-proteiini-kompleksien syntymisessä.

Mäntymaassa sekä liukoiset aminohappo- että liukoisen orgaanisen typen määrät olivat suurempia kuin varpukasvimaissa, mikä viittaa siihen, että mänty tehostaa liukoisen typen vapautumista orgaanisesta aineksestä todennäköisesti mykorritsojensa avulla. Tämä voi myös lisätä typen mineralisaatiota. Tulosten perusteella myös varpukasvit saattavat käyttää typenlähteenään aminohappojen tai polyfenoli-proteiini-kompleksien orgaanista typpeä. Vedettäessä johtopäätöksiä saaduista tuloksista on kuitenkin otettava huomioon, että luonnontilaisessa metsämaassa typen käyttäytymiseen ja kasvilajien typen ottoon vaikuttaa useampia tekijöitä samanaikaisesti kuin laboratoriokokeen kontrolloiduissa olosuhteissa.

Varpukasvien vaikutus metsämaan typen reaktioihin on vähän tutkittu aihe. Etenkään puolukasta ei ole tehty tutkimuksia, jotka antaisivat tarkempaa kuvaa sen vaikutuksesta maassa tapahtuvaan typen kiertoon. Esimerkiksi varpukasvien juurten hajoamisnopeutta ja niiden hajoamistuotteita voisi tutkia samantapaisella koejärjestelyllä kuin tässä tutkimuksessa tehtiin. Merkkiaineiden avulla voisi myös selvittää, mihin hajoamistuotteet päätyvät maassa. Tämä lisäisi tietoa maan orgaanisen aineksen muodostumisesta ja sen laadusta. Myös lisätutkimus eri varpukasvien sienijuurten toiminnasta lisäisi tietoa metsämaan typen kierrosta ja orgaanisen typen käyttökelpoisuudesta kasveille.

Viitteet

Adamczyk, B., Kitunen, V. & Smolander, A. 2008. Protein precipitation by tannins in soil organic horizon and vegetation in relation to tree species. *Biology and Fertility of Soils* 45: 55–64.

- Adamczyk, B., Adamczyk, S., Smolander, A. & Kitunen, V. 2011. Tannic acid and Norway spruce condensed tannins can precipitate various organic compounds. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 628–637.
- Bajwa, R., Abuarghub, S. & Read, D.J. 1985. The biology of mycorrhiza in the ericaceae. X. The utilization of proteins and the production of proteolytic enzymes by the mycorrhizal endophyte and by mycorrhizal plants. *New Phytologist* 101: 469–486.
- Baldwin, I.T. & Schultz, J.C. 1984. Tannins lost from Sugar maple (*Acer saccharum* Marsh) and Yellow birch (*Betula allegheniensis* Britt.) leaf litter. *Soil Biology & Biochemistry* 16: 421–422.
- Bending, G.D. & Read, D.J. 1996a. Effects of the soluble polyphenol tannic acid on the activities of ericoid and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 1595–1602.
- Bending, G.D. & Read, D.J. 1996b. Nitrogen mobilization from protein-polyphenol complex by ericoid and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 1603–1612.
- Berg, B. 2000. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management* 133: 13–22.
- Bradley, R., Burt, A.J. & Read, D.J. 1981. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature* 292: 335–337.
- Darrouzet-Nardi, A., Ladd, M.P. & Weintraub, M.N. 2013. Fluorescent microplate analysis of amino acids and other primary amines in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 57: 78–82.
- De Boer, W., Tietema, A., Klein Gunnewiek, P.J.A. & Laanbroek, H.J. 1992. The chemolithotrophy ammonium-oxidizing community in a nitrogen-saturated acid forest soil in relation to pH-dependent nitrifying activity. *Soil Biology & Biochemistry* 24: 229–234.

Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A. & Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer Series in Wood Science. Springer-Verlag, Yhdysvallat. 407 s. ISBN: 0-387-51600-X.

Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Giráldez, F.J. & Mantecón, A.R. 2002. Condensed tannin content of several shrub species from mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology* 95: 215–226.

Hedin, L.O., Armesto, J.J. & Johnson, A.H. 1995. Patterns of nutrient loss from unpolluted, old-growth temperate forests: Evaluation of biogeochemical theory. *Ecology* 76: 493–509.

Heinonsalo, J. & Lehto, T. 2013. Sienijuuret. Teoksessa: Timonen, S. & Valkonen, J. (toim.). Sienten biologia. Gaudeamus Oy, Helsinki. 448 s. ISBN: 978-952-495-297-2.

Hood-Nowotny, R., Umana, N.H.-N., Inselbacher, E. & Wanek, P.O.-L.W. 2010. Alternative methods for measuring inorganic, organic and total dissolved nitrogen in soil. *Soil Science Society of America* 74: 1018–1026.

Hättenschwiler, S. & Vitousek, P.M. 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Reviews. TREE* 15: 238–243.

Iason, G.R., Hartley, S.E. & Duncan, A.J. 1993. Chemical composition of *Calluna vulgaris* (Ericaceae): Do responses to fertilizer vary with phenological stage? *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 315–321.

Ilvesniemi, H., Giesler, R., van Hees, P., Magnusson, T. & Melkerud, P.A. 2000. General description of the sampling techniques and the sites investigated in the Fennoscandinavian podsolization project. *Geoderma* 94: 109–123.

Jalal, M.A.F., Read, D.J. & Haslam, E. 1982. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry* 21: 1397–1401.

Jalal, M.A.F. & Read, D.J. 1983. The organic acid composition of *Calluna* heathland soil with special reference to phyto- and fungitoxicity. II. Monthly quantitative determination of the organic acid content of *Calluna* and spruce dominated soils. *Plant and Soil* 70: 273–286.

Jones, C.G. & Hartley, S.E. 1999. A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* 86: 27–44.

Jones, D.L., Owen, A.G. & Farrar, J.F. 2002. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1893–1902.

Jones, D.L., Shannon, D., Murphy, D. & Farrar, J. 2004. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 749–756.

Kanerva, S., Kitunen, V., Kiikkilä, O., Lojonen, J. & Smolander, A. 2006. Response of soil C and N transformations to tannin fractions originating from Scots pine and Norway spruce needles. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 1364–1374.

Kanerva, S., Kitunen, V., Lojonen, J. & Smolander, A. 2008. Phenolic compounds and terpenes in soil organic horizon layers under silver birch, Norway spruce and Scots pine. *Biology and Fertility of Soils* 44: 547–556.

Keskitalo, M., Hyvärinen, H. & Pihlava, J.-M. 2001. Yleistä fenolisista yhdisteistä. Teoksessa: Hyvärinen, H. (toim.). Kasvipäriset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit. Kirjallisuuskatsaus. MTT:n julkaisuja, sarja A, Jyväskylän yliopistopaino. MTT, Jokioinen. 97 s. ISBN: 951-729-630-4 (Verkkojulkaisu).

Kielahö, A.-J., Pihlatie, M., Dominguez Carrasco, M., Kanerva, S., Parshintsev, J., Riekkola, M.-L., Pumpanen, J. & Heinonsalo, J. 2016. Stimulation of soil organic nitrogen pool: the effect of plant and soil organic matter degrading enzymes. *Soil Biology & Biochemistry* 96: 97–106.

Korhonen, J.F.J., Pihlatie, M., Pumpanen, J., Aaltonen, H., Hari, P., Levula, J., Kieloaho, A.-J., Nikinmaa, E., Vesala, T. & Ilvesniemi, H. 2013. Nitrogen balance of a boreal Scots pine forest. *Biogeosciences* 10: 1083–1095.

Kraus, T.E.C., Yu, Z., Preston, C.M., Dahlgren, R.A. & Zasoski, R.J. 2003a. Linking chemical reactivity and protein precipitation to structural characteristics of foliar tannins. *Journal of Chemical Ecology* 29: 703–730.

Kraus, T.E.C., Dahlgren, R.A. & Zasoski, R.J. 2003b. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review. *Plant and Soil* 256: 41–66.

Kraus, T.E.C., Zasoski, R.J. & Dahlgren, R.A. 2004. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil* 262: 95–109.

Kuiters, A.T. 1990. Role of phenolic substances from decomposing forest litter in plant-soil interactions. *Acta Botanica Neerlandica* 39: 329–348.

Leake, J.R. & Read, D.J. 1989. The effects of phenolic compounds on nitrogen mobilization by ericoid mycorrhizal systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 29: 225–236.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D. & Clark, D. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. 13. painos. Benjamin Cummings, Yhdysvallat. 1150 s. ISBN 13: 978-0-321-73551-5.

Martens, D.A. ja Loeffelmann, K.L. 2003. Soil amino acid composition quantified by acid hydrolysis and anion chromatography-pulsed amperometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6521–6529.

Northup, R.R., Dahlgren, R.A. & Yu, Z. 1995a. Intraspecific variation of conifer phenolic concentration on a marine terrace soil acidity gradient; a new interpretation. *Plant and Soil* 171: 255–262.

- Northup, R.R., Yu, Z., Dahlgren, R.A. & Vogt, K.A. 1995b. Polyphenol control of nitrogen release from pine litter. *Nature* 377: 227–229.
- Näsholm, T., Ekblad, A., Nordin, A., Giesler, R. Högberg, M. & Högberg, P. 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392: 914–916.
- Olk, D.C., Samson, M.I. & Gapas, P. 2007. Inhibition of nitrogen mineralization in young humic fractions by anaerobic decomposition of rice crop residues. *European Journal of Soil Science* 58: 270–281.
- Ossipova, S., Ossipov, V., Haukioja, E., Loonen, J. & Pihlaja, K. 2001. Proanthocyanidins of mountain birch leaves: quantification and properties. *Phytochemical Analysis* 12: 128–133.
- Persson, J. & Näsholm, T. 2001. Amino acid uptake: a widespread ability among boreal forest plants. *Ecology Letters* 4: 434–438.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N. & Chan, B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25: 223–230.
- Priha, O. & Smolander, A. 1999. Nitrogen transformations in soil under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at two forest sites. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 965–977.
- Qualls, R.G., Haines, B.L. & Swank, W.T. 1991. Fluxes of dissolved organic nutrients and humic substances in a deciduous forest. *Ecology* 72: 254–266.
- Rice, J.A. 2001. Humin. *Soil Science* 166: 848–857.
- Schofield, P., Mbugua, D.M. & Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91: 21–40.

Sowden, F.J., Chen, Y. Schnitzer, M. 1977. The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41: 1524–1526.

Stevenson, F.J. 1982. *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions.* John Wiley & Sons, Inc, New York, Yhdysvallat. 443 s. ISBN: 0-471-09299-1.

Stevenson, F.J. & Cole, M.A. 1999. *Cycles of soil. Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients.* 2. painos. John Wiley & Sons, Inc. New York, Yhdysvallat. 427 s. ISBN: 0-471-32071-4.

Tipping, E. 2002. *Cation binding by humic substances.* Cambridge environmental chemistry series 11. Cambridge University Press, Cambridge, Yhdistynyt kuningaskunta. 434 s. ISBN: 0-511-03514-4 (Verkkojulkaisu, Adobe Reader).

Vesterdal, L., Schmidt, I.K., Callesen, I., Nilsson, L.O. & Gundersen, P. 2008. Carbon and nitrogen in forest floor and mineral soil under six common European tree species. *Forest Ecology and Management* 255: 35–48.